Année scolaire
1973-1974
N° d'ordre : 5

THESES

présentées

A L'UNIVERSITE DE BORDEAUX II
Unité d'Enseignement et de Recherches des Sciences pharmaceutiques

pour

LE DOCTORAT D'ETAT EN PHARMACIE

par

Farzad NAMIGOHAR

Pharmacien
C.E.S. de Contrôle Physico-Chimique des Médicaments
C.E.S. de Pharmacodynamie et Essais Biologiques des Médicaments
C.E.S. de Chimie Thérapeutique
né le 7 avril 1948 à Téhéran (Iran)

1ere Thèse : Applications de la spectrophotométrie infra-rouge au contrôle des médicaments.

2e Thèse : R.M.N. et contrôle physico-chimique des médicaments.

Présentées et Soutenues publiquement le 5 septembre 1974
devant la Commission d'Examen

MM.	P. MESNARD	Professeur	Président
	R. CROCKETT	Professeur	Juges
	G, DEVAUX	Professeur	
Mme	C. HAZANE	Agrégé	

Editions Bergeret, 71-73, rue Leyteire – BORDEAUX – Tél. (56) 91.12.59

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547319_0034

Année scolaire
1973-1974
N° d'ordre : 5

THESES

présentées

A L'UNIVERSITE DE BORDEAUX II
Unité d'Enseignement et de Recherches des Sciences pharmaceutiques

pour

LE DOCTORAT D'ETAT EN PHARMACIE

par

Farzad NAMIGOHAR

Pharmacien
C.E.S. de Contrôle Physico-Chimique des Médicaments
C.E.S. de Pharmacodynamie et Essais Biologiques des Médicaments
C.E.S. de Chimie Thérapeutique
né le 7 avril 1948 à Téhéran (Iran)

1ere Thèse : Applications de la spectrophotométrie infra-rouge au contrôle des médicaments.

2e Thèse : R.M.N. et contrôle physico-chimique des médicaments.

Présentées et Soutenues publiquement le 5 septembre 1974
devant la Commission d'Examen

MM.	P. MESNARD	Professeur	Président
	R. CROCKETT	Professeur	Juges
	G, DEVAUX	Professeur	
Mme	C. HAZANE	Agrégé	

Editions Bergeret, 71-73, rue Leyteire – BORDEAUX – Tél. (56) 91.12.59

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A MES PARENTS

A MA FEMME

A MES FRERES

A toute l'équipe
du Laboratoire de Contrôle
Physico - Chimique des Médicaments

et

du Laboratoire de Chimie Organique

A NOS JUGES

Madame le Docteur C. HAZANE

Maître de Conférences agrégé de Chimie analytique

C'est toujours avec beaucoup d'intérêt que nous avons suivi votre enseignement aux C.E.S. de Contrôle physico-chimique des médicaments. Nous avons apprécié vos qualités d'enseignant et de chercheur dynamique.
Nous vous remercions d'avoir accepté de juger ce travail.

Monsieur le Professeur G. DEVAUX

Professeur de Pharmacie chimique
Licencié ès Sciences

Vous nous avez accueilli avec la plus grande bienveillance dans votre laboratoire de pharmacie chimique. Vous avez inlassablement mis à notre disposition votre grand savoir, votre aide efficace et votre temps précieux.
Nous vous exprimons notre sincère , vive et amicale gratitude.

Monsieur le Professeur R. CROCKETT

Professeur de Biochimie pharmaceutique
Licencié ès Sciences
Ancien interne en Pharmacie des Hôpitaux de Bordeaux
Médaille d'Or de l'internat
Ancien Assistant des Hôpitaux
Chevalier des Palmes académiques

Nous tenons à vous remercier, vous le savant expert analyste et biochimiste, pour votre confiance et la bienveillance que vous nous témoignez en acceptant de juger ce travail.
Qu'il nous soit permis de vous exprimer notre respectueuse gratitude.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur P. MESNARD

Professeur de Chimie organique et Chimie analytique
Membre correspondant de l'Académie de Pharmacie
Docteur ès Sciences physiques
Chevalier de la Légion d'Honneur
Officier de l'Ordre national du Mérite
Officier des Palmes académiques
Chevalier de l'Ordre de la Santé publique
Médaille de Vermeil du Service de Santé de la Marine
Membre correspondant de la Real Academia de Farmacia de Madrid et Barcelone
Membre d'Honneur de la Société de Pharmacie de Bénarès (Inde)

Votre exemple et votre judicieux enseignement ont été pour nous une source permanente d'enrichissement intellectuel, moral et ont largement contribué à notre formation.

Vous nous avez accordé un temps que nous savons précieux, avec une grande patience et une grande amabilité, pour corriger notre manuscrit.

Veuillez trouver ici, mon Cher Maître, l'expression de notre grande admiration et le témoignage de notre profond respect.

APPLICATIONS DE LA SPECTROPHOTOMETRIE INFRA-ROUGE AU CONTROLE DES MEDICAMENTS

*

S O M M A I R E

Page

INTRODUCTION 8

PREMIERE PARTIE : GENERALITES SUR LA SPECTROPHOTOMETRIE I. R. - Travaux antérieurs sur ses applications au contrôle des médicaments.

CHAPITRE I. GENERALITES SUR LA SPECTROPHOTOMETRIE INFRA-ROUGE 11

I. Nature du spectre I. R. 11

II. Technique de la spectrophotométrie I. R. 12

1°. Echantillonnage en phase gazeuse

2°. Echantillonnage en phase liquide

3°. Echantillonnage en phase solide

A. Suspension
B. Dépôts de solides
C. Pastilles
C. Réflexion totale atténuée (A.T.R.)

Page

III. Application de la spectrophotométrie I. R. à l'analyse qualitative 15

1°. Spectre I. R.

2°. Spectre I. R. et impuretés

3°. Identification dans les produits finis

IV. Application de la spectrophotométrie I. R. à l'analyse quantitative 18

V. Avantages de la spectrophotométrie I. R. pour l'analyse des médicaments 21

1°. Spécifité

2°. Fidélité

3°. Sensibilité

CHAPITRE II. APPLICATIONS DE LA SPECTROPHOTOMETRIE I. R. AU CONTROLE DES MEDICAMENTS - TRAVAUX ANTERIEURS 24

I. Amines 24

II. Chloroiodohydroxyquinoléine 25

III. Amphétamine et tryptamine 25

IV. Méprobamate 25

V. Phénothiazines 25

VI. Barbituriques..... 26

VII. Polyvinylpyrrolidone (P.V.P.) 26

Page

DEUXIEME PARTIE. APPLICATIONS DE LA SPECTROPHOTOMETRIE INFRA-ROUGE AU CONTROLE DES MEDICAMENTS - Recherches personnelles.

CHAPITRE I. VITAMINES 30

I. Vitamine A (acétate et palmitate d'axérophol) 31

II. Vitamine D_2 et D_3 - identification et dosage 35

1°. Etude des solutions alcooliques de vitamines D_2 et D_3

A. Principe

B. Technique

a. Dosage
b. Identification

2°. Applications aux formes pharmaceutiques

A. Dosage

B. Identification

III. Vitamine E (acétate de DL-α tocophérol) - Dosage 42

1°. Principe

2°. Technique

3°. Applications aux formes pharmaceutiques

IV. Vitamine B_1 (chlorhydrate de thiamine) - Identification et dosage 47

1°. Séparation chromatographique de la vitamine B_1

Page

2°. Dosage spectrophotométrique

A. Etalon

B. Médicament

C. Mesure spectrophotométrique

3°. Identification

V. Vitamine PP (Nicotinamide) - Dosage 54

1°. Principe

2°. Technique

A. Préparation de la solution extractive

B. Dosage

3°. Formes pharmaceutiques étudiées

CHAPITRE II. SULFAMIDES DIURETIQUES - Identification 61

I. Principe 62

II. Technique 62

CHAPITRE III. ALCALOÏDES ET BASES ORGANIQUES Identification et dosage 68

I. Alcaloïdes des solonacées 69

II. Alcaloïdes du Veratrum 69

III. Alcaloïdes de l'opium 70

1°. Morphine et codéine

2°. Chlorhydrate de héroïne

IV. Alcaloïdes isoquinoléiniques 70

Page

V. Alcaloïdes des quinquinas 71

VI. Alcaloïdes du bulle de colchicique 71

VII. Alcaloïdes ménispermacées 72

VIII. Alcaloïdes indoliques 72

1°. Principe

2°. Technique

A. Dosage

B. Identification

3°. Applications aux comprimés

A. Dosage

B. Identification

IX. Identification et dosage du tartarte d'ergotamine, du méthane sulfonate de dihydroergotanime, du méthanesulfonate de dihydroergotoxine 79

1°. Dosage

A. Préparation de la solution étalon

B. Applications aux médicaments

2°. Identification

X. Tannate de bases organiques 91

CHAPITRE IV. ANTIBIOTIQUES 99

I. Pénicillines 100

II. Thiolutine et Auréothricine 103

III. Primycine 103

Page

IV. Chloramphénicol 103

V. Erythromycine et propionylérythromycine 104

1°. Principe

2°. Technique

3°. Applications aux médicaments

A. Dosage

VI. Spiramycine (Rovamycine) 111

1°. Principe

2°. Technique

3°. Applications aux formes pharmaceutiques

A. Dosage

VII. Virginiamycine 115

1°. Principe

2°. Technique

A. Dosage

B. Identification

3°. Applications aux formes pharmaceutiques

A. Dosage

B. Identification

VIII. Céfradine 119

CHAPITRE V. STEROIDES 121

I. Hydroépiandrostérone, testostérone et 17β oestradiol 122

Page

II. Oestrone, équiline, équilénine 122

III. Prégnolone 123

IV. Stérols du soja 123

V. Corticostéroïdes 123

1°. Principe
2°. Technique
3°. Applications aux médicaments

CHAPITRE VI. ANTIPYRETIQUES 129

I. Dosage de l'aspirine 132

1°. Principe
2°. Technique
3°. Application

II. Amidopyrine 135

1°. Principe
2°. Technique
3°. Application

III. Phénacétine 138

1°. Principe
2°. Technique

IV. Caféine 140

CONCLUSIONS 142

I N T R O D U C T I O N

En dix ans le nombre des spectrophotomètres infra-rouge a décuplé; la France possède actuellement plus d'appareils qu'il n'y en avait en service dans le monde en 1940.

Quelle est donc la raison de ce récent et prodigieux essor d'une technique dont le principe, au moins, est connu depuis fort longtemps ?

La découverte du rayonnement I.R. par HERSCHEL remonte à 1800 et le premier spectrophotomètre digne de ce nom a été réalisé par KOBLENTZ dès 1805. Lors de la seconde guerre mondiale, la spectrophotométrie I.R., en passant des laboratoires de physique aux laboratoires de chimie, étendait considérablement son champ d'application.

L'avènement de la chimiothérapie et le développement des recherches pharmacologiques ont eu pour conséquence l'utilisation en thérapeutique de substances organiques de plus en plus complexes, souvent de structures très voisines, fréquemment utilisées en associations; leur toxicité et leur altérabilité ne sont pas exclues. Ainsi, la tâche de l'analyste s'est considérablement accrue.

Pour y faire face il s'est tourné vers les techniques instrumentales nouvelles qui, en révolutionnant les méthodes improprement dénommées "techniques physiques" ont donné à la chimie une impulsion surprenante.

La spectrophotométrie dans l'ultra-violet s'est imposée la première en analyse pharmaceutique, toujours très appréciée, elle est en passe d'être rejointe par la spectrophotométrie dans l'infra-rouge qui, servie par un appareillage mieux adapté, permet de réaliser rapidement, aussi bien la caractérisation spécifique que le dosage précis d'une molécule organique.

Les premières applications remontent à 1946 avec les travaux de FURCHGOTT et coll. dont nous parlerons au sujet de stéroïde, suivies en 1947 des recherches BOWLING BARNES sur les pénicillines, les recherches se sont multipliées depuis lors et les textes officiels s'y réfèrent.

L'U.S.P. XVI (United states pharmacopeia) est la première pharmacopée à préconiser la méthode pour l'identification et le dosage d'un grand nombre de substances organiques.

L'U.S.P. XVII et le N.F. XII (National formulary) la mentionnent dans 150 monographies se rapportant à 99 substances. La pharmacopée française l'a retenue pour l'identification de cortisone (57).

De plus grâce à une nouvelle méthode (réflexion totale atténuée ou A.T.R.) il est possible d'effectuer le contrôle des conditionnements : bouchons, flacons en matières plastiques etc ...

Le but de ce travail a pour objet de décrire un certain nombre d'applications de la spectrophotométrie infra-rouge au contrôle des médicaments. Il a été réalisé dans le cadre des recherches poursuivies dans le service de contrôle physico-chimique des médicaments de l'Université de Bordeaux II.

Avant de l'exposer nous rappellerons quelques données essentielles sur la spectrophotométrie infra-rouge ainsi que les principaux travaux déjà effectués dans le domaine du contrôle des médicaments.

P R E M I E R E P A R T I E

GENERALITES SUR LA SPECTROPHOTOMETRIE INFRA-ROUGE

TRAVAUX ANTERIEURS SUR SES APPLICATIONS AU CONTROLE DES MEDICAMENTS

C H A P I T R E I

GENERALITES SUR LA SPECTROPHOTOMETRIE INFRA-ROUGE

I. NATURE DU SPECTRE I. R.

Un spectre infra-rouge est habituellement tracé entre 2 et 15 microns, dans la région spectrale dite "du chlorure de sodium". Il présente des bandes d'absorption dont le nombre et l'intensité varient en fonction de la structure moléculaire du corps examiné.

En général, ces bandes sont suffisamment nombreuses pour donner au spectre une complexité qui lui confère sa spécifité.

II. TECHNIQUES DE LA SPECTROPHOTOMETRIE I. R.

En spectrophotométrie dans l'infra-rouge l'échantillonnage est un problème délicat. A cause de la transparence du solvant, du support et des cellules, et aussi de l'humidité qui peut altérer l'aspect d'un spectre jusqu'à le rendre illisible. La diminution de l'humidité atmosphérique facilite l'échantillonnage, prolonge la vie des éléments au chlorure et au bromure de sodium et limite les pertes d'énergies.

Il existe trois façons d'effectuer l'échantillonnage d'un produit suivant son état physique :

1°. Echantillonnage en phase gazeuse.

En phase vapeur ou en phase gazeuse, les cellules utilisées peuvent être d'épaisseur très différentes (2 cm à 40 m) suivant la concentration de la substance à examiner.

2°. Echantillonnage en phase liquide.

Peu de solvants sont utilisables en infrarouge.

Le sulfure de carbone, le tétrachlorure de carbone, le chloroforme sont les plus courants.

L'emploi du bromoforme est plus rare.

L'absorption plus importante des autres solvants, malgré un pouvoir de dissolution souvent plus élevé, en limite l'utilisation à certaines régions du spectre.

L'examen d'une solution s'effectue généralement sous une épaisseur de 0,1 à 2 mm pour une concentration de 0,1 à 1 %. Les cellules sont constituées d'une monture métallique en deux parties, qui maintient les deux

fenêtres solidaires d'un anneau intercalaire qui en détermine l'épaisseur. L'étanchéité de ce joint permet l'emploi de la même cellule pour différentes concentrations.

Cette forme d'échantillonnage convient bien pour les dosages, à la condition d'utiliser toujours la même cellule, sans la même épaisseur, pour le témoin et le produit à doser.

3°. *Echantillonnage en phase solide.*

L'intérêt de l'échantillonnage en phase solide s'est accrû pour deux raisons :

- insolubilité de la plupart des substances organiques dans les solvants non polaires
- limites d'utilisation très étroites de la plupart des solvants et prises d'essai relativement importantes.

Il existe trois méthodes générales pour étudier les solides cristallisés; toutes nécessitent la réduction du solide en très petites particules (perte d'énergie par diffraction des particules de dimensions supérieures au micron), qui sont ensuite diluées en suspension ou dans une pastille d'halogénure alcalin, ou sont tout simplement étalées à la surface d'une fenêtre de la cuve.

A. SUSPENSION.

Le Nujol (nom commun de l'huile de paraffine pharmaceutique) est le liant le plus communément employé pour les suspensions. On peut aussi utiliser le Fluorolube et l'hexachlorobutadiène, en particulier pour l'étude de régions spectrales où les bandes du Nujol sont gênantes. L'échantillon (2 à 5 mg) est broyé avec le liant (une goutte) soit dans un broyeur soit dans un mortier. Certaines substances donnent des sus-

pensions satisfaisantes au bout d'une à deux minutes. D'autres demandent un temps plus long pouvant aller jusqu'à trente minutes.

Le broyage terminé, on place la suspension sur une lamelle en sel gemme à l'aide d'une spatule. Puis on recouvre la lamelle par une deuxième; on presse doucement, de manière à étaler la suspension sous forme de film mince. Cette méthode ne convient que pour l'identification.

B. DEPOTS DE SOLIDES.

On peut également obtenir le spectre d'un solide.

Pour cela on dépose à la surface d'une lamelle une goutte de solution concentrée que l'on laisse évaporer doucement : on obtient ainsi une couche uniforme solide analogue à un film. Il faut parfois essayer un grand nombre de solvants ou mélanges de solvants, avant d'obtenir un dépôt correct, car une couche de cristaux de taille plus ou moins grande peut donner un spectre de très mauvaise qualité, en raison de la diffusion de la lumière.

C. PASTILLES (DISQUES).

On broie intimement un halogénure alcalin pur et sec (150 à 250 mg), chlorure au bromure de potassium, avec l'échantillon solide.

On utilise en général 1 mg de substance pour 100 mg d'halogénure alcalin. On comprime le mélange sous pression de 8 tonnes à la température ordinaire, sous vide; on obtient une pastille solide généralement transparente. Les disques présentent, sur les suspensions, l'avantage d'une détermination possible de la concentration et de l'épaisseur de l'échantillon, d'où leur emploi en analyse quantitative. Cependant, il se produit également des pertes d'énergie par diffusion.

De plus, il n'est pas toujours aisé de réaliser une dispersion homogène de l'échantillon.

D. REFLEXION TOTALE ATTENUEE (A.T.R.).

La technique récente de réflexion totale atténuée permet de résoudre de nouveaux problèmes. Les échantillons solides opaques et irréductibles peuvent eux aussi faire l'objet d'un examen en I. R.

Cette méthode, suggérée par FAHRENFORT et VISSER (32) basée sur la réflexion d'une radiation sur l'interface de deux milieux de réfrigérence différente.

On l'utilise pour les matériaux opaques : films épais de polymères, bouchons de caoutchouc etc ...

III. APPLICATION DE LA SPECTROPHOTOMETRIE I. R. A L'ANALYSE QUALITATIVE.

1°. Spectre I. R.

Les relations entre structure et spectre infrarouge ont fait l'objet de nombreux travaux.

Pour des molécules simples il a été possible de calculer la fréquence des bandes d'absorption et de la vérifier expérimentalement et pour un grand nombre de molécules d'établir empiriquement les relations entre structure et fréquence : diverses régions spectrales ont été attribuées aux bandes correspondant aux groupes fonctionnels, Hydroxyl, Carbonyl, Carboxyl, Amine etc ...

La fréquence varie légèrement, pour une fonction donnée, avec la structure de la molécule.

La présence de deux groupements fonctionnels à proximité l'un de l'autre peut modifier, parfois considérablement, la position et l'intensité des bandes

correspondant aux vibrations de chacun de ces groupements. On citera le dosage de la vitamine PP, pour laquelle on a attribué la bande 1 700 cm^{-1} à la fonction amide primaire, mais où l'on ne reconnait pas la bande Co et NH_2 car il y a participation de plusieurs vibrations. Chaque bande peut être considérée comme caractéristique d'un groupe fonctionnel mettant en oeuvre des photons et non plus une réaction chimique. De plus, la fréquence exacte et l'intensité traduisent l'influence de la structure de la molécule et celle des groupes environnants sur la vibration considérée.

Le niveau d' information donné par chaque bande élucidée est donc en tout point comparable à celui d'une réaction de l'analyse fonctionnelle.

Les bandes non attribuées ne sont cependant pas inutiles pour l'identification, il en est d'ailleurs de même pour de nombreuses réactions colorées, dont le mécanisme n'est pas élucidé, mais qui ont pu servir à caractériser certaines molécules chaque bande peut donc être valablement considérée comme une réaction individuelle et l'on comprend, à voir la complexité des spectres I. R. qu'il soit possible d'affirmer que le niveau d'information qu'ils procurent est très supérieur à celui de 4 ou 5 réactions colorées ou mesures de R_F. De plus, chaque valeur d'extinction constitue une constante physique qui renforce la sécurité apportée par le tableau des fréquences.

On pourrait objecter que l'interprétation du spectre I.R. est bien plus compliquée que celle d'une réaction. Mais il n'est pas forcément question d'envisager les rapports entre structure et spectre, il suffit, le plus souvent, dans le cas qui nous occupe, de comparer le spectre du composant du médicament à celui d'une substance pure.

2°. Spectre I. R. et impuretés.

On admet que l'on peut déceler les impuretés dans un produit pur par spectrophotométrie I. R.

En réalité leur recherche est délicate, car elle dépend de nombreux facteurs

- Performance des appareils utilisés
- Manipulation
- Interprétation des résultats

Lorsque des impuretés sont décelées, il est nécessaire de vérifier leur présence par comparaison des spectres du produit pur et du produit à étudier, qui ne sont plus superposables. Mais dans le cas que nous préoccupe ici, c'est à dire l'identification d'une molécule, nous ne considérons que l'allure générale du spectre, qui n'est pas modifiée par les impuretés. C'est d'ailleurs pourquoi des produits aussi complexes que les stéroïdes, les alcaloïdes, les vitamines, les antibiotiques, les sulfamides, peuvent être identifiés sans difficulté dans les médicaments malgré le médiocre état de pureté permis par leur extraction.

Prenons par exemple le cas d'un sulfamide diurétique que nous avons étudié et auquel nous reviendrons le spectre du produit pur et celui du produit extrait dans les comprimés ne sont pas superposables, mais ils sont très semblables, ce qui, pour nous, est suffisamment concluant (figure 13, page67).

3°. Identification dans les produits finis.

En général, cette identification est possible, mais chaque cas doit être considéré comme particulier. On peut cependant formuler un certain nombre de remarques.

La sécurité de l'identification des principes actifs dans le produit fini est apportée non seulement par le contrôle du médicament déterminé, mais encore par

l'analyse des matières premières initiales et par le contrôle en cours de fabrication, ainsi que par la surveillance de celle-ci par des pharmaciens compétents. Il peut dans bien des cas rivaliser avec d'autres méthodes de diagnose rapide, tout en apportant ce qui est avantage non négligeable, une sécurité de tout premier ordre. Il peut notablement être envisagé lorsque la concentration en principe actif est suffisante, à moins de consentir à l'utilisation de microméthodes. En effet, la faible extinction spécifique exige des concentrations plus élevées que pour l'ultra-violet par exemple, ou pour de nombreuses réactions colorées associées au développement des chromatoplaques.

Lorsque les spectres des principes actifs permettront une identification après une séparation sommaire.

IV. APPLICATION DE LA SPECTROPHOTOMETRIE I. R. A L'ANALYSE QUANTITATIVE.

L'analyse quantitative par spectrométrie d'absorption I.R. est possible, même dans le cas d'un mélange dont le spectre est formé de la superposition des spectres des constituants. On choisit généralement pour chacun de ces derniers, une ou plusieurs bandes-clés dans une région où les autres constituants sont transparents ou absorbent peu. L'analyse repose sur la loi de Beer-Lambert, d'après laquelle pour une fréquence donnée, la densité optique (ou logarithme de l'inverse de la transmission) est proportionnelle à la concentration et à l'épaisseur traversée.

$$D = \varepsilon C l = \log = \frac{I}{I_o} = \log \frac{1}{T}$$

D = densité optique

ε = coefficient spécifique d'extinction
C = concentration
l = épaisseur traversée
I, I_o = intensités des radiations après et avant traversée de la substance
T = transmission $\frac{I}{I_o}$

Si plusieurs constituants contribuent à l'absorption à la fréquence donnée, la densité optique mesurée est égale à la somme des densités optiques de chacun d'eux (loi d'additivité des densités optiques). Si le mélange comporte n constituant, on choisit n bandes-clés, de fréquence ν_1, ν_2, ν_3, ν_n et on mesure la densité optique à chacune de ces fréquences. On obtient ainsi un système de n équations linéaires à n inconnues.

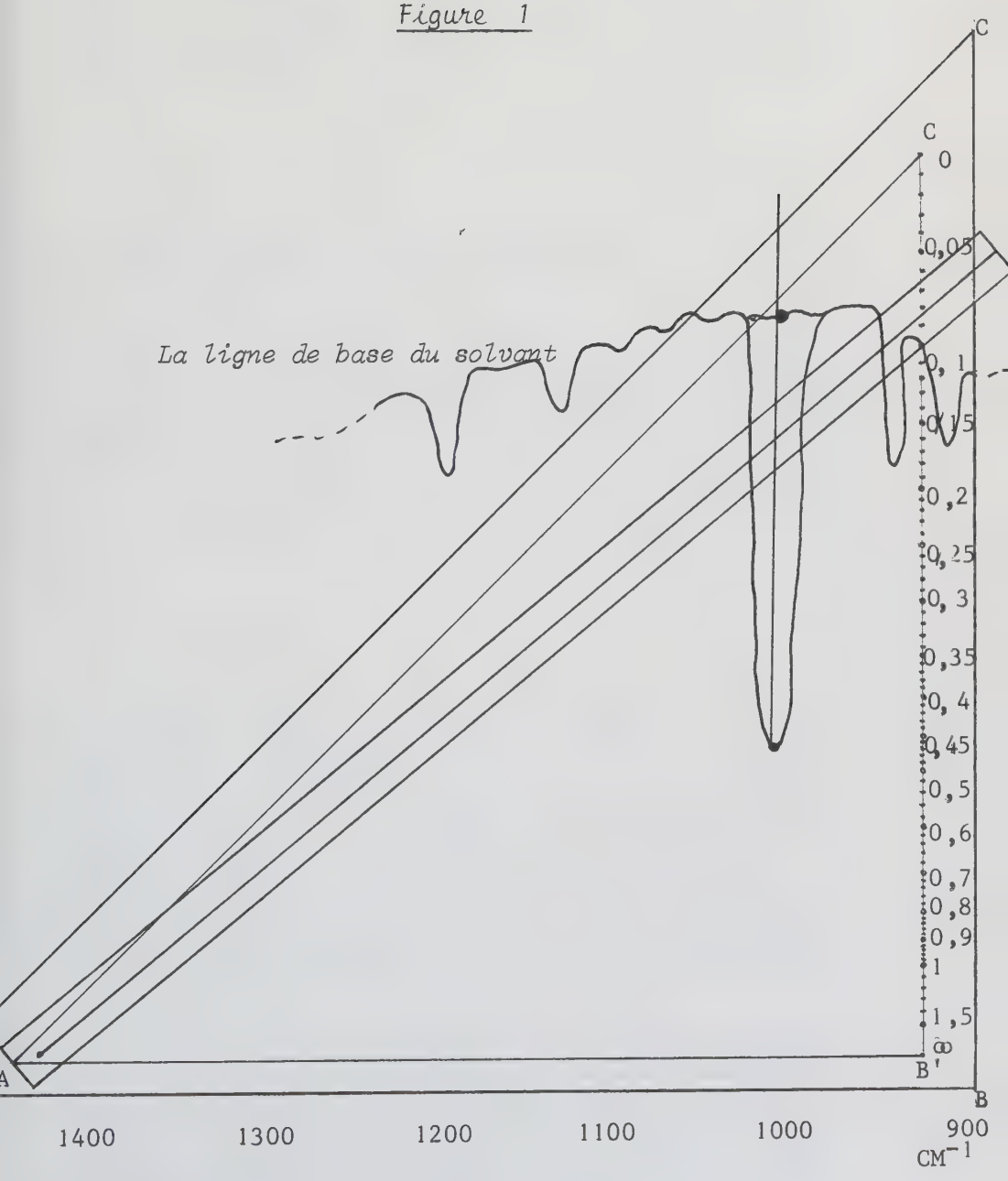
La grandeur considérée est donc la transmission (ou la densité optique) et il faut la mesurer avec le plus de précision possible. On utilise le plus souvent la méthode des lignes de bases; d'après la forme du spectre on fait choix d'une ligne de référence à partir de laquelle on mesure la densité optique.

WRIGHT et coll. (83), après avoir choisi la bande convenable procèdent à l' intégration du pic délimité par la courbe d'absorption et la tangente aux deux minimums qui l'encadrent.

Quant à nous, nous avons mesuré la densité optique à partir de la ligne de base de solvant, grâce à une règle spéciale qui la donne directement en fonction de la hauteur du pic. Elle est composé d'un triangle fixe et d'une baguette mobile.

La base A' B' du triangle doit être superposée lors de la mesure à l'axe des abscisses, le côté A' C' est disposé de façon qu'il passe par l'intersection de la base du solvant et de la perpendiculaire à cette base passant par le maximum du pic (à longueur d'onde voulue).

Figure 1


C
C
0
0,05
La ligne de base du solvant
0, 1
0,15
0,2
0,25
0, 3
0,35
0, 4
0,45
0, 5
0, 6
0, 7
0, 8
0, 9
1
1, 5
∞
A
B'
B
1400
1300
1200
1100
1000
900
CM⁻¹

Sur le troisième côté du triangle sont indiquées les densités optiques; la règlette en se déplaçant autour du point A' et en passant par le maximum du pic à longueur d'onde choisie indique directement la densité optique (figure 1).

V. AVANTAGES DE LA SPECTROPHOTOMETRIE I. R. POUR L'ANALYSE DES MEDICAMENTS.

Les méthodes utilisées pour le contrôle physicochimique des médicaments doivent répondre à différents critères : simplicité, rapidité, précision, spécifité, fidèlité, sensibilité.

Or ce sont là précisément les caractéristiques de la spectrophotométrie I. R.

1°. Spécifité.

Par absorption d'un photon, une molécule voit son énergie augmenter; un électron passe sur une orbite supérieure; la vibration, la rotation de la molécule sont accrues. Les absorptions d'énergie sont très sélectives : elle ne se produisent que pour des photons d'énergie égale à la différence entre deux états énergétiques, l'énergie d'une molécule est quantifiée. Ces rayonnements I. R. ne possèdent pas l'énergie suffisante pour provoquer des transitions électroniques et ils ne donnent lieu qu'à la vibration et à la rotation moléculaires.

Un spectre de vibration ne peut correspondre qu'à une molécule. Toute modification dans la structure de l'édifice moléculaire détermine une variation d'une ou de plusieurs fréquences, qui peut être très faible, si un seul atome est en cause, beaucoup plus importante, parfois considérable si elle porte sur un radical polyatomique.

On peut donc s'attendre à ce que les molécules de structure voisine fournissent des spectres très différents. L'examen des quatre vingt mille spectres rassemblés dans les fichiers (SADTLER, I.B.M., D.M.S. etc ...) montre qu'il y a fort peu de spectres semblables.

2°. Fidélité.

Un même échantillon d'un produit fournit des spectres qui sont rigoureusement reproductibles quant à la position des bandes et à leur intensité, à la condition que les règlages de l'appareil ne soient pas modifiés. Par contre, les spectres de plusieurs échantillons d'un même produit, à la même concentration, peuvent présenter des variations d'intensité, qui dépendent de leur préparation, surtout lorsque les mesures sont effectuées en milieu solide, selon la technique des pastilles de bromure de potassium. Elles dépendent pour une large part du manipulateur.

3°. Sensibilité.

Les principaux caractères des spectres infrarouges font ressortir les différences qui les distinguent des spectres enregistrés dans l'ultra-violet. Ces derniers présentent le plus souvent une faible spécifité, du fait du nombre réduit des bandes d'absorption. Contrairement aux spectres infra-rouges, qui dans la région comprise entre 2 et 15 μ sont principalement des spectres de vibration et de vibration-rotation, les spectres d'absorption dans l'ultra-violet sont des spectres électroniques, dont le tracé est l'enveloppe des N fréquences correspondant aux N états électroniques des atomes. Le manque de spécificité de ces spectres provient aussi des difficultés rencontrées pour situer avec précision la position des maximums d'absorption, parce que les bandes sont larges et présentent des sommets arrondis qui ne peuvent être définis qu'à 5 ou 10 Å près. Seuls les composés gazeux ou à l'état de vapeur fournissent

des spectres ultra-violets dont les bandes sont suffisamment fines pour qu'il soit possible de déterminer avec précision la position de leur maximum.

Par ailleurs, la spectrométrie ultra-violette est d'un emploi plus limité que la spectrophotométrie infra-rouge, tous les corps n'absorbent pas les radiations comprises entre 2 200 et 3 000 Å.

La spectrophotométrie infra-rouge apparaît donc comme une méthode plus générale et plus sûre que la spectrométrie ultra-violette car elle permet pratiquement l'identification et le dosage spécifiques de tous les composés organiques. Toutefois, dans certains cas particuliers la spectrométrie ultra-violette permet une meilleure sensibilité.

C H A P I T R E I I

APPLICATIONS DE LA SPECTROPHOTOMETRIE INFRA-ROUGE AU CONTROLE DES MEDICAMENTS

TRAVAUX ANTERIEURS

I. AMINES.

L'analyse des amines par spectrophotométrie I. R. a été l'objet de nombreux travaux (41, 65).

THOMPSON et coll. (70) ont déterminé les spectres de 80 sels d'amines, dont 55 amines tertiaires, 15 amines secondaires et 10 amines primaires. Les bandes caractéristiques entre 4 000 cm^{-1} à 2 000 cm^{-1} permettent de différencier les amines des trois classes.

II. CHLORO-IODOHYDROXYQUINOLEÏNE.

BIGEARD et coll. (7) ont décrit une méthode semi quantitative relative à la chloro-iodohydroxyquinoléïne et à des impuretés éventuelles. Elle a été reprise par URBANYI et coll. (71) sur le plan qualitatif et sur le plan quantitatif.

III. AMPHETAMINE ET TRYPTAMINE.

MESLEY R. J. et coll. (44) ont identifié grâce aux spectres I.R. quelques dérivés de l'amphétamine et la tryptamine.

IV. MEPROBAMATE.

RYAN et coll. (63) appliquent la spectrophotométrie I. R. à l'analyse automatique du méprobamate, et effectuent 20 déterminations par heure avec une variation standard relative de ± 1,08 %.

V. PHENOTHIAZINES.

WARREN et coll. (75) ont identifié 23 dérivés de la phénothiazine par spectrophotométrie I. R. : chlorpromazine, chlorophénothiazine, prométhazine, etc ...

J. BARBE et coll. (5) ont établi la structure du complexe phénothiazine-thiocyanate de Cobalt.

VI. BARBITURIQUES.

Les barbituriques ont été dosés par spectrophotométrie I. R. dans quelques 400 spécialités. A condition que la séparation soit correcte (9,72) la méthode est rarement en défaut.

Tous les barbituriques présentent, dans la région de 1 700 cm^{-1}, un spectre caractéristique constitué par trois bandes d'absorption, attribuées aux fonctions Carbonyle.

DANIELSSON et coll. (21) en ont étudié un certain nombre, KUHNERT et coll. (39) ont remarqué que leur stabilité est en rapport direct avec la fréquence de la vibration NH, CLEVERELY (17) a standardisé les différentes techniques de pastillage avec KBR pour une vingtaine de composés.

ATKINSON (3) a identifié les barbituriques dans des comprimés et des capsules par la méthode A.T.R.

FRENCH et coll. (26) ont caractérisé le phénobarbital en mélange avec de la quinine, de la quinidine et de l'hydroquinine.

WASHBURN et coll. (81) ont étudié les intermédiaires au cours de la synthèse des barbituriques.

VII. POLYVINYLPYRROLIDONE (P.V.P. (61).

Le P.V.P. est largement utilisé dans la fabrication des granules pour ses propriétés agglomérantes. Mais son poids moléculaire élevé rend son analyse très difficile, lorsqu'il est mélangé avec d'autres excipients. Il peut être dosé en solution chloroformique par spectrophotométrie I.R. .

Les applications de la spectrophotométrie I. R. à l'analyse des alcaloïdes et des bases organiques, des vitamines, des antibiotiques, des stéroïdes, des sulfamides, des antipyrétiques ont été également étudiées, nous les envisagerons au cours de la deuxième partie, car nous avons orienté nos recherches dans ces différents domaines.

D E U X I E M E P A R T I E

APPLICATIONS DE LA SPECTROPHOTOMETRIE INFRA-ROUGE AU CONTROLE DES MEDICAMENTS

RECHERCHES PERSONNELLES

Nos recherches portent sur diverses familles thérapeutiques :

- les vitamines
- les sulfamides diurétiques
- les alcaloïdes et les bases organiques
- les antibiotiques
- les stéroïdes
- les antipyrétiques

-:-

C H A P I T R E I

VITAMINES

Le dosage des vitamines pose différents problèmes, en raison de la similitude de leur solubilité (hydrosolubles ou liposolubles) et en raison de leurs associations dont le nombre augmente de jour en jour sur le marché pharmaceutique. De nombreuses techniques ont été proposées :

- les unes utilisent la séparation des vitamines par
  - . chromatographie sur couche mince
  - . chromatographie sur colonne
  - . chromatographie en phase gaz-liquide

- les autres mettent à profit les caractères physico-chimiques distinctifs.

Parmi eux l'absorption dans l'infra-rouge offre de nouvelles possibilités analytiques et est applicable au contrôle des médicaments.

L'acide ascorbique (82), les vitamines K (29), la vitamine B (55), ont fait l'objet de différents travaux.

Nors recherches ont trait aux vitamines suivantes :

- vitamine A - Acétate et palmitate d'axérophtol
- vitamines D_2 et D_3
- vitamine E - Acétate de DL α tocophérol
- vitamine B_1 - chlorhydrate de thiamine.

I. VITAMINE A (ACETATE ET PALMITATE D'AXEROPHTOL).

Les deux isomères du carotène ont été étudiés par spectrophotométrie I. R. dans la région de 710 - 830 cm^{-1}. L'absorption est nettement différente pour chacun d'eux (42).

Nous avons essayé de caractériser et de doser l'acétate et le palmitate de vitamine A dans les spécialités pharmaceutiques.

Nous avons établi au préalable les spectres d'absorption en solution dans le sulfure de carbone; ils présentent un maximum à 1 750 cm^{-1}, dû au carbonyle des acides organiques et applicable en analyse pour la vitamine A, à la condition que la vitamine soit dissoute dans ce solvant; or dans les préparations pharmaceutiques, elle se trouve en solution huileuse; les huiles absorbant dans la même région, la méthode devient inapplicable.

Cependant la spectrophotométrie I. R. nous a permis de calculer le pourcentage d'acétate et de palmitate de vitamine A dans un mélange.

Il y a en effet, pour un poid égal, plus de carbonyle dans l'acétate que dans le palmitate; la densité optique du premier sera donc supérieure à celle du second.

Technique.

On dissout séparément de chacun des deux sels dans 10 ml de sulfure de carbone, on obtient donc deux solutions con tenant :

10 mg/ml d'acétate d'axérophtol
10 mg/ml de palmitate d'axérophtol.

Ces deux solutions sont introduites successivement, dans une cellule à I. R.; on lit la densité optique à partir de la ligne de base du sulfure de carbone à 1 750 cm^{-1} (figure 2).

On prépare d'autre part un mélange x de ces deux sels : on en dissout 100 mg dans 10 ml de sulfure de carbone, on obtient donc une solution contenant :

10 mg/ml du mélange des deux sels de vitamine A.

La densité optique sera plus ou moins grande suivant le pourcentage d'acétate et de palmitate d'axérophtol (figure 2).

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau I.

Tableau I

Sels de vitamine A	*Densité optique*	*Pourcentage*
Palmitate	0,25	100 %
Acétate	0,52	100 %
Mélange des deux sels	0,34	X

Il est facile de calculer le pourcentage de X :

$$0,52 - 0,25 = 0,27$$
$$0,52 - 0,34 = 0,18$$
$$0,34 - 0,25 = 0,09$$

$\frac{0,18}{0,27} \times 100 = 66$ % de palmitate axérophtol

$\frac{0,09}{0,27} \times 100 = 34$ % de l'acétate axérophtol

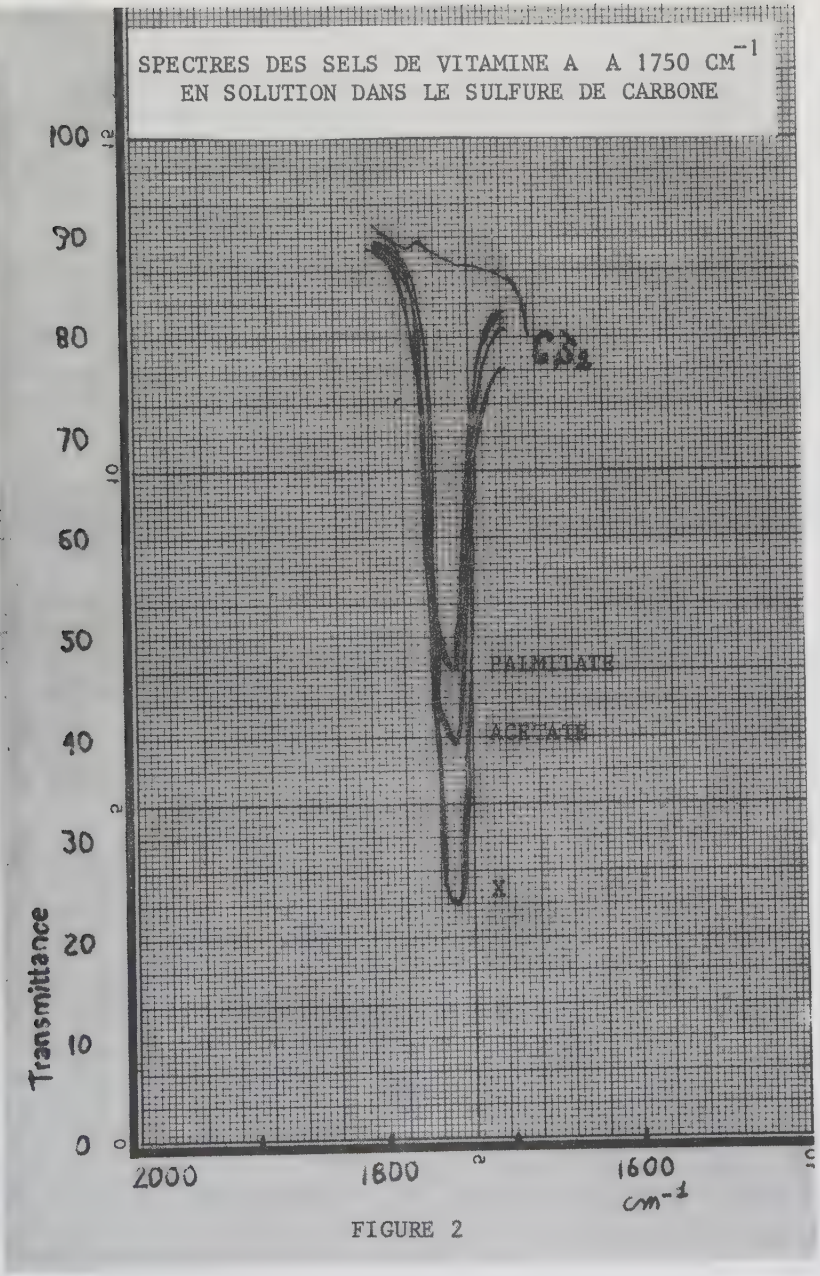

SPECTRES DES SELS DE VITAMINE A A 1750 CM^{-1}
EN SOLUTION DANS LE SULFURE DE CARBONE
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Transmittance
CS_2
PALMITATE
ACETATE
X
2000
1800
1600
cm-1

FIGURE 2

II. VITAMINES D_2 ET D_3.

Identification et dosage.

Seule la méthode biologique peut différencier les vitamines D_2 et D_3. Mais elle est longue et ne convient pas pour le contrôle de routine. La spectrophotométrie I. R. pallie cet inconvénient et apparaît à première vue utilisable.

MORRIS W. A. et coll. (48) ont calculé le pourcentage de chaque vitamine dans un mélange, où les vitamines totales sont dosées par colorimétrie (réaction de Carr et Price).

En effet en solution dans le sulfure de carbone la vitamine D_2 présente un pic d'absorption à 10,3 µ et un pic secondaire à 10,4 µ. La vitamine D_3 possède seulement un pic à 10,4 µ.

Les deux vitamines ont une faible absorption à 10,5 µ.

Les auteurs calculent le pourcentage à l'aide du rapport :

$$(A_{10,3\ \mu} - A_{10,5\ \mu}) \ / \ (A_{10,4\ \mu} - A_{10,5\ \mu})$$

Il est indépendant de la concentration des deux vitamines dans le mélange. Il est égal à - 0,25 pour 100 % de vitamine D_3 et 1,4 pour 100 % de vitamines D_2.

Nous avons repris l'identification et le dosage des deux vitamines dans les spécialités pharmaceutiques.

1°. ETUDE DES SOLUTIONS ALCOOLIQUES DE VITAMINES D_2 ET D_3.

A. PRINCIPE.

La loi de proportionnalité entre concentration et densité optique est vérifiée entre 6 mg/ml et 25 mg/ml à 1 060 cm^{-1} en solution dans le sulfure de carbone sous une épaisseur 0,4 mm.

B. TECHNIQUE.

a. Dosage.

On dissout 250 mg de vitamine D_2 ou D_3 dans 10 ml de sulfure de carbone (25 mg/ml).

On prépare une gamme entre 6 mg/ml à 25 mg/ml.

On lit en cellule Nacl la hauteur du pic à 1 061 cm^{-1} par rapport à la ligne de base du sulfure de carbone sous une épaisseur 0,4 mm (figure 3).

b. Identification.

1 à 2 mg du produit est pastillé avec 200 mg de KBr. On détermine le spectre d'absorption (figure 4 et 5).

On remarque que la vitamine D_2 possède une bande d'absorption due à la liaison C-H à 980 cm^{-1} alors que celle-ci est absente pour la vitamine D_3.

2°. Applications aux formes pharmaceutiques.

A. DOSAGE.

Cette méthode ne convient pas si les vitamines D_2 et D_3 sont mélangées à d'autres vitamines liposolubles : vitamines A et E, bien que ces dernieres n'ab-

sorbent pas à la longueur d'onde considérée. Ceci est dû à leur faible concentration dans les préparations pharmaceutiques qui nécessite une prise d'essai importante. Le contenu d'une ampoule de vitamine D_2 ou D_3 en solution hydroalcoolique, correspondant à 15 mg, est introduit dans un flacon de 5 ml muni d'un bouchon de caoutchouc portant une tubulure pour faire le vide. On évapore le solvant sous vide au bain-marie à 50°. Il faut éviter tout chauffage excessif qui détruirait la vitamine. Le résidu est repris par 1 ml de sulfure de carbone (la même technique sera utilisée dans le cas des alcaloïdes de l'ergot de seigle). On obtient une solution à 15 mg/ml de vitamines D_2 et D_3, que l'on traite de la même façon que la gamme étalon.

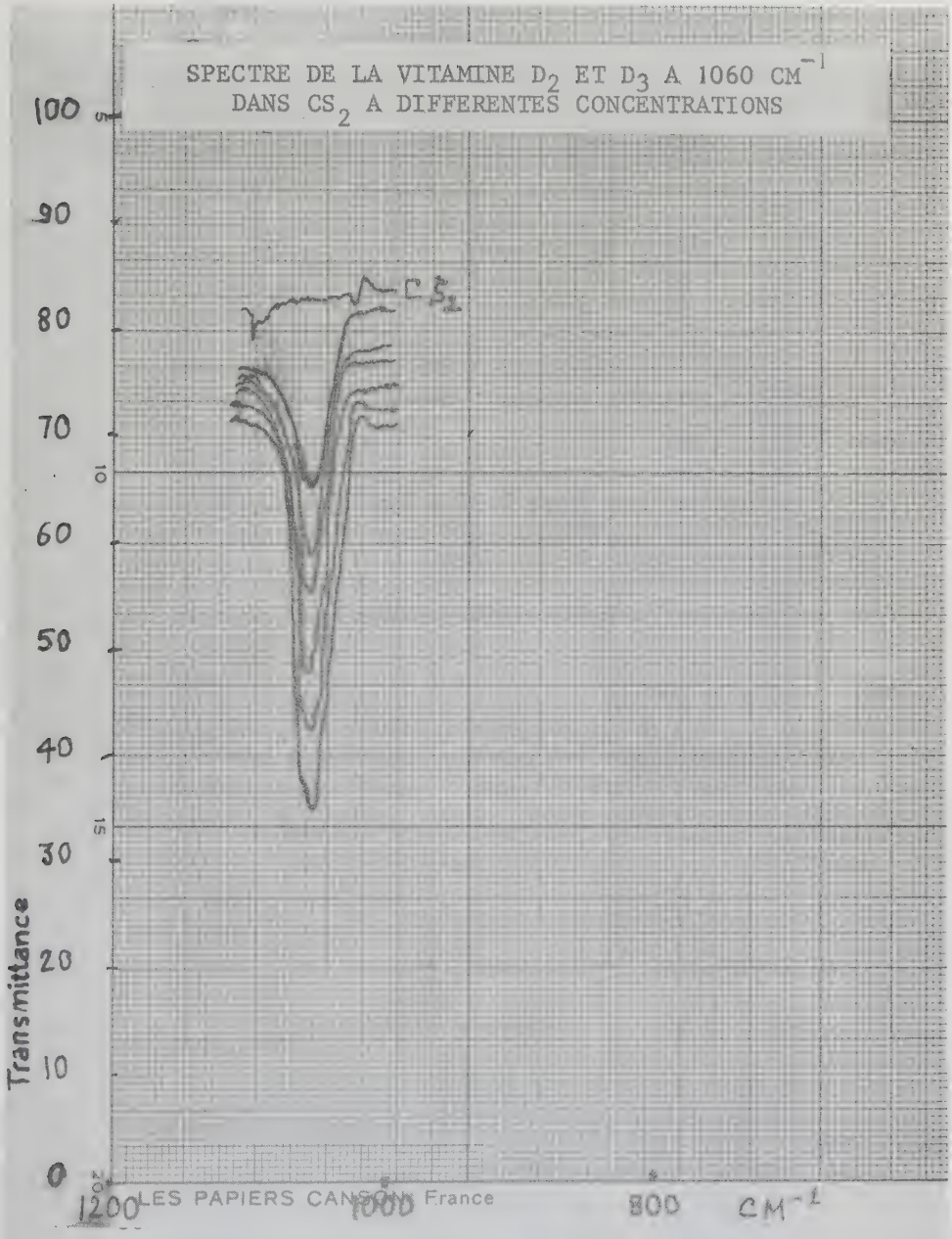
Les résultats figurent dans le tableau II.

Tableau II

Nom des spécialités	*Formes pharmaceutiques*	*Composants*	*Résultats*	
			Théorie	*trouvé*
Stérogyl ®	Ampoules de solution hydroalcoolique	Vitamine D_2	10 mg/ml	1,85 mg/ml
Vitamine D_3 B.O.N. ®	Ampoule de solution hydroalcoolique	Vitamine D_3 Hydroquinone	5 mg/ml	4,9 mg/ml

B. IDENTIFICATION.

Une ampoule correspond à 5 ou 10 mg est traitée de la même façon que précédemment, 1 à 2 mg du résidu obtenu est mélangé avec 200 mg de KBr. Le spectre doit correspondre à celui de la substance étalon.



concentrations (mg)	25	20	15	12	10	6
D.O.	0,38	0,3	0,23	0,18	0,15	0,1

FIGURE 3

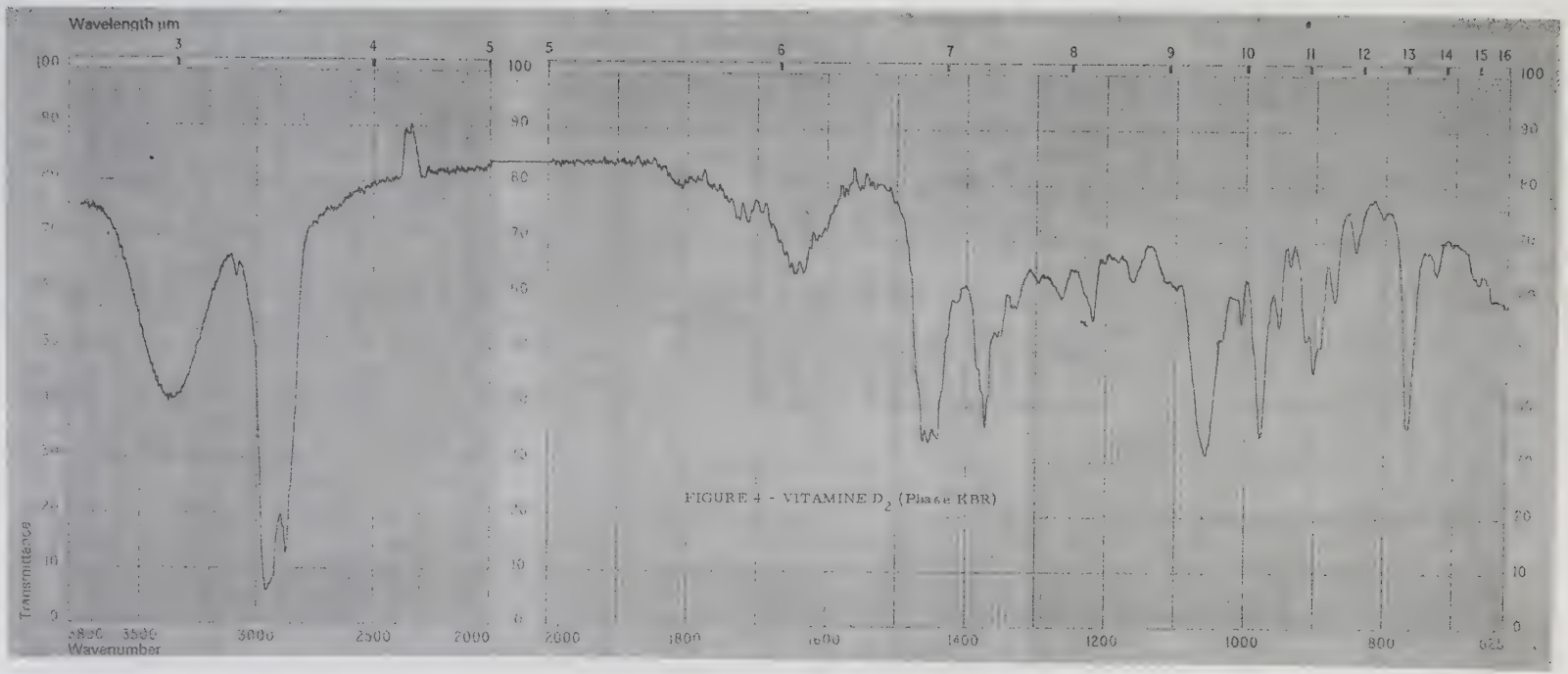
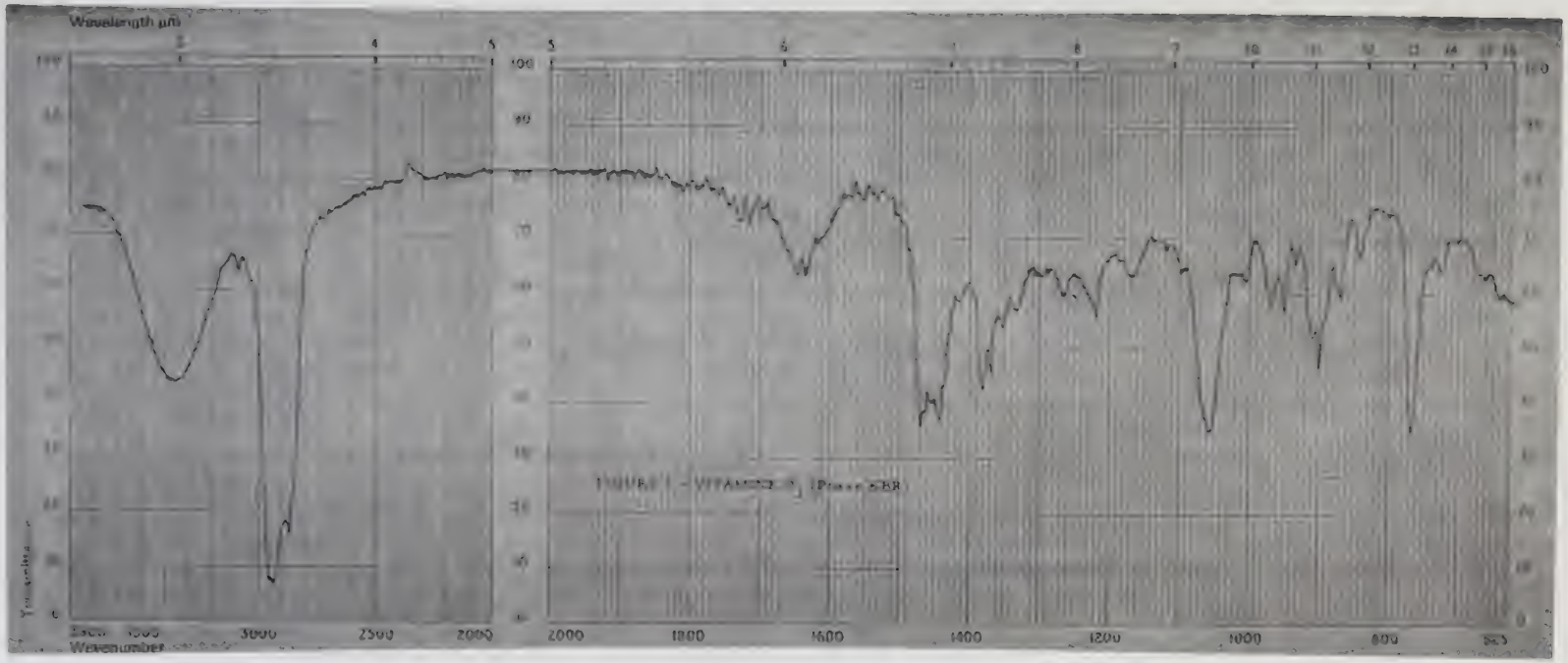


FIGURE 4 - VITAMINE D_2 (Phase KBR)


Wavelength μm
Wavenumber
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800

III. VITAMINE E (ACETATE DE DL-α TOCOPHEROL).

Dosage.

Diverses méthodes ont été proposées pour le dosage de la vitamine E dans les médicaments :

- titrage par la solution cérico-ammoniacale; après saponification, on titre par la solution cérico-ammoniacale 0,01 N en présence d'une goutte de solution sulfurique de diphéryl-amine.
- méthode colorimétrique; après saponification, on examine à 520 nm la solution colorée, obtenue après addition de chlorure ferrique et 1'α, α' dipyridyl
- méthode spectrophotométrie U.V.

La méthode spectrophotométrique est effectuée en solution éthanolique à 285 nm.

Ces méthodes sont longues et ne conviennent pas au dosage de l'acétate de DL-α tocophérol, en mélange à d'autres principes actifs dans les spécialités pharmaceutiques.

La spectrophotométrie I.R., précise et très rapide, nous semble préférable.

1°. Principe.

Nous retenons le pic à 1 210 cm^{-1} pour deux raisons :

- la loi de Beer-Lambert est vérifiée pour des concentrations variant entre 700 µg et 3 000 µg
- les vitamines liposolubles A et D, souvent associées à la vitamine E, n'absorbent pas à 1 210 cm^{-1}.

2°. Technique.

On pèse très exactement 150 mg d'acétate de DL-α tocophérol que l'on dissout dans 50 ml de sulfure de carbone; on obtient une solution à 3 mg/ml; on prépare une gamme allant de 700 µg/ml à 3000 µg/ml.

On introduit les solutions par ordre décroîssant dans une cellule à Nacl sous une épaisseur de 0,4 mm. On mesure la hauteur du pic à 1 210 cm^{-1} par rapport à la ligne de base du sulfure de carbone (figure 6).

3°. Applications aux formes pharmaceutiques.

Bien que la vitamine E soit très soluble dans le sulfure de carbone, son extraction reste déficitaire par suite de la présence de l'excipient (gélatine, gomme végétale). Nous sommes parvenu à un résultat correct en opérant de la façon suivante :

- *Extraction.*

Un nombre de comprimés correspondant à 20 mg d'acétate de DL-α tocophérol sont pulvérisés au mortier. La poudre est introduite dans la cartouche d'un appareil de soxhlet. On l'épuise par l'éther de pétrole pendant 12 h à 50°.

- *Dosage.*

Le solvant est évaporé au bain-marie; le résidu est dissous dans 10 ml de sulfure de carbone; on obtient une solution à 2 mg/ml d'acétate de DL-α tocophérol. L'absorption de cette solution dans l'infrarouge est mesurée comme ci-après.

Nos résultats sont consignés dans le tableau III.

TABLEAU III

Nom des spécialités	*Formes pharmaceutiques*	*Composants*	*Acétate DL-α tocophérol*	
			Théorie	*trouvé*
EPHYNAL ®	comprimés	Acétate DL-α tocophérol	10 mg/comp.	9,8 mg/comp.
ROVIGNON ®	comprimés	. Vitamine A . Vitamine E	70 mg/comp.	69 mg/comp.
DIANAVIT ®	capsules	17α-méthyl 17β-hydroxy androsta 1,4-diène 3-one, axérophtol, vit. B_1, B_6, B_2, B_{12}, C, PP Acétate DL-α tocophérol	8,33mg/cap.	8,2 mg/cap.

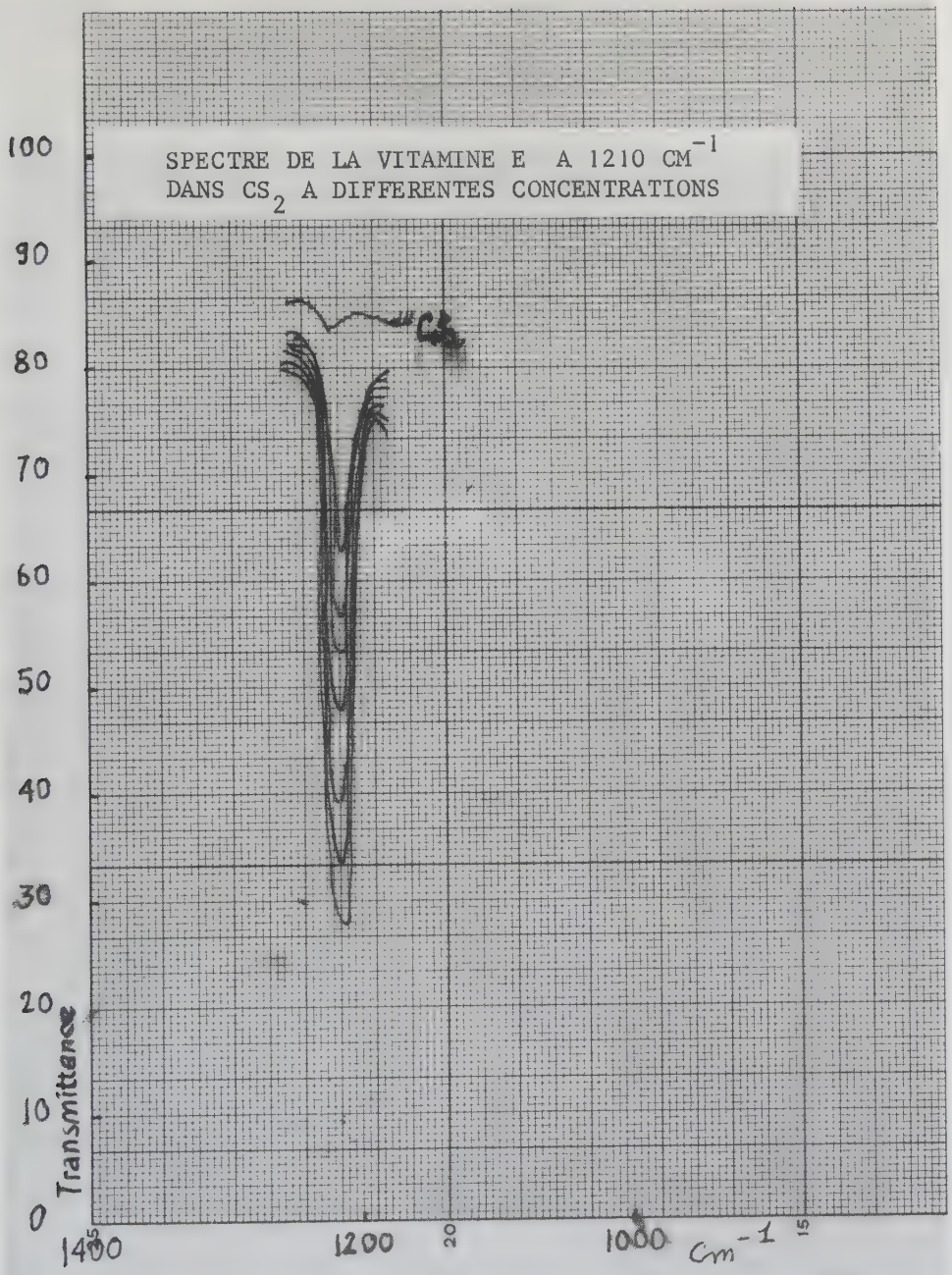
Les principes actifs autres que la vitamine E n'absorbent pas à 1 210 cm^{-1}.

Les vitamines liposolubles telles que les vitamines A et D possèdent un fond d'absorption à cette longueur d'onde.

Mais il sera négligeable dans les spécialités examinées, car la quantité de vitamines A et D est moins importante dans la prise d'essai par rapport à la vitamine E. Notre but étant de proposer des méthodes aussi générales que possible, nous avons préparé un mélange très concentré en vitamine A. On peut prévoir un fond d'absorption plus important qui entraînera un résultat excédentaire.

Mais au lieu de calculer la densité optique à partir de la ligne du solvant, nous effectuons une mesure simple qui élimine le fond d'absorption, et nous permet de corriger la densité optique par la relation suivante (figure 7).

$$\text{Log } \frac{A_o}{A} = \text{Log } \frac{A_o'}{A'}$$



oncentrations (µg)	3 000	2 500	2 000	1 500	1 200	1 000	700
D.O.	0,48	0,40	0,32	0,24	0,19	0,16	0,115

FIGURE 6

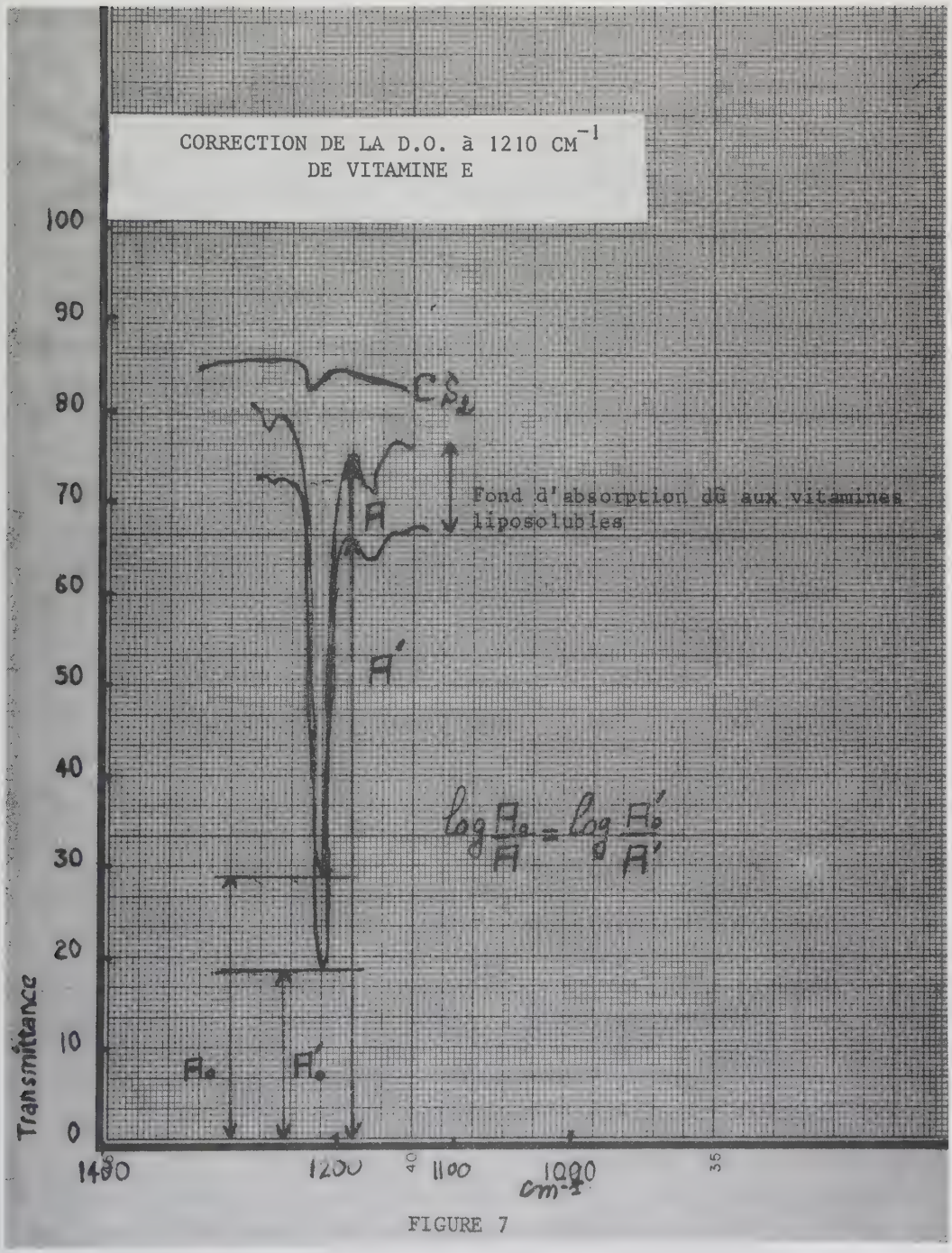

CORRECTION DE LA D.O. à 1210 CM^{-1}
DE VITAMINE E
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Transmittance
Fond d'absorption dû aux vitamines liposolubles
A
A'
$\log \frac{A_0}{A} = \log \frac{A'_0}{A'}$
1400
1200
1100
1000
cm-1

FIGURE 7

IV. VITAMINE B_1 (CHLORHYDRATE DE THIAMINE).

Identification et dosage.

Il n'est pas toujours possible de séparer au moyen d'un solvant des vitamines contenues dans un médicament. C'est le cas de la vitamine B_1 en mélange avec d'autres vitamines hydrosolubles.

Nous avons étudié les comprimés Bécozyme ® qui contiennent, outre lá chlorhydrate de thiamine, de la Riboflavine, du nicotinamide, de la Pyridoxine, du Pantothénate de Calcium.

La vitamine B_1 est insoluble dans les solvants utilisables en spectrophotométrie I. R. Nous sommes donc obligé d'opérer en phase solide (pastillage avec KBr).

Considérons un mélange de trois principes actifs A, B et C après compression.

Même si B et C n'absorbent pas à la longueur d'onde choisie pour A, ils rendent impossible le dosage de ce dernier. La pastille sera chargée en B et C et il va se produire un phénomène de diffusion.

C'est pourquoi il est indispensable de procéder à une séparation sélective de A (cet inconvénient ne se présente pas en solution). La séparation peut être effectuée par chromatographie sur colonne, préconisée par différents auteurs, mais la méthode est longue et délicate pour une application quantitative. La chromatographie sur couche mince nous paraît recommandable à la condition de séparer une quantité suffisante de vitamine B_1.

En effet pour un mélange de quantité de produit de l'ordre de µg avec 100 à 200 mg de KBr nécessaire pour le pastillage, le spectre est invisible.

Nous pouvons opérer de deux façons :

1°. On procède à un micropastillage avec 20 mg de KBr, ce qui nécessite un micromoule.

Nous disposons de plusieurs techniques pour pastiller l'éluat du chromatogramme contenant une dizaine de µg de principe actif (1, 8, 11, 43, 64, 66, 69)

a) on laisse tomber goutte à goutte la solution de vitamine B_1 sur le KBr dans un verre de montre placé sur une platine chauffante;

les pertes se sont révélées considérables; en effet une faible fraction de substance, se dépose sur KBr

b) on évapore une solution de KBr et de vitamine B_1

c) on prépare une micropastille en forme de cupule grâce à un moule spécial; on y introduit l'éluat; après évaporisation, la cupule est séchée, refroidie et pesée; on broie très finement le résidu dans un petit mortier d'agate.

Une fraction de la poudre obtenue, voisine de 20 mg, est utilisée pour la confection d'une micropastille selon la technique proposée par BOEHLER.

2°. Nous proposons une autre méthode qui consiste à déposer la solution, non plus à l'état de spot, mais sur une certaine longueur (8 à 10 cm) afin de séparer la quantité de l'ordre du mg suffisante pour être mélangée avec 100 ou 200 mg de KBr.

1°. Séparation chromatographique de la vitamine B_1 préparation des plaques.

30 g de Kieslgel G F 254 sont mélangés à 60 ml d'eau; la suspension est étendue sur une épaisseur de 0,5 mm. Les plaques sont activées par passage à l'étuve à 120° pendant 20 mn.

Solvant.

Acide acétique - Acétone - Méthanol - Benzène (5 : 5 : 20 : 70).

Préparation de la solution à analyser.

On traite 8 dragées débarrassées de leur couche colorée par lavage avec deux fois 4 ml d'eau distillée.

On filtre et on complète à 10 ml avec le même solvant.

Chromatographie.

On dépose très régulièrement 0,1 ml de cette solution, contenant théoriquement 120 mg/ml de vitamine B_1, sur une longueur de 8 cm.

Révélation.

Après migration sur 14 cm, la plaque est examinée en lumière de Wood à 254 nm. La vitamine B_1 reste sur la ligne de départ (extinction de fluorescence) entièrement séparée des autres vitamines.

2°. *Dosage spectrophotométrique.*

A. ETALON.

On pèse exactement 75 mg de chlorhydrate de thiamine, que l'on dissout dans 50 ml d'éthanol R.P.: on obtient une solution contenant 1,5 mg/ml à partir de laquelle on prépare une gamme allant de 300 µg/ml à 1 500 µg/ml (limites de la validité de la loi Beer Lambert à 1 650 cm^{-1}). A 1 ml de chaque dilution, on ajoute, dans une coupelle, 10 ml d'éthanol R.P. et 200 mg de KBr (qui se dissout totalement); on laisse évaporer très doucement (chauffage rapide entraînerait risque de projections).

Après dessication on obtient un résidu homogène du KBr et déchlorhydrate de thiamine. On en prélève 180 mg on porte à l'étuve à 140° pendant 2 h, et on effectue la pastillage.

B. MEDICAMENT.

La surface de gel correspondante ayant retenu la vitamine B_1 est prélevée par grattage à l'aide d'une spatule, et éluée par 20 à 30 ml d'éthanol R.P., cette solution doit être filtrée pour éliminer le Kieselgel dont les particules, de très faibles tailles passent à travers les filtres ordinaires. Après plusieurs essais en vue de tourner la difficulté, nous avons retenu l'utilisation d'un verre filtré n° 3, le volume du filtrat est amené à 10 ml environ par évaporisation de l'éthanol. La solution contenant théoriquement 1,2 mg de chlorhydrate de thiamine est empastillée de la même façon que la gamme étalon.

C. MESURE SPECTROPHOTOMETRIQUE.

On examine successivement les pastilles au spectrophotomètre par ordre décroissant de concentration. On lit la densité optique de chaque dilution et celui du

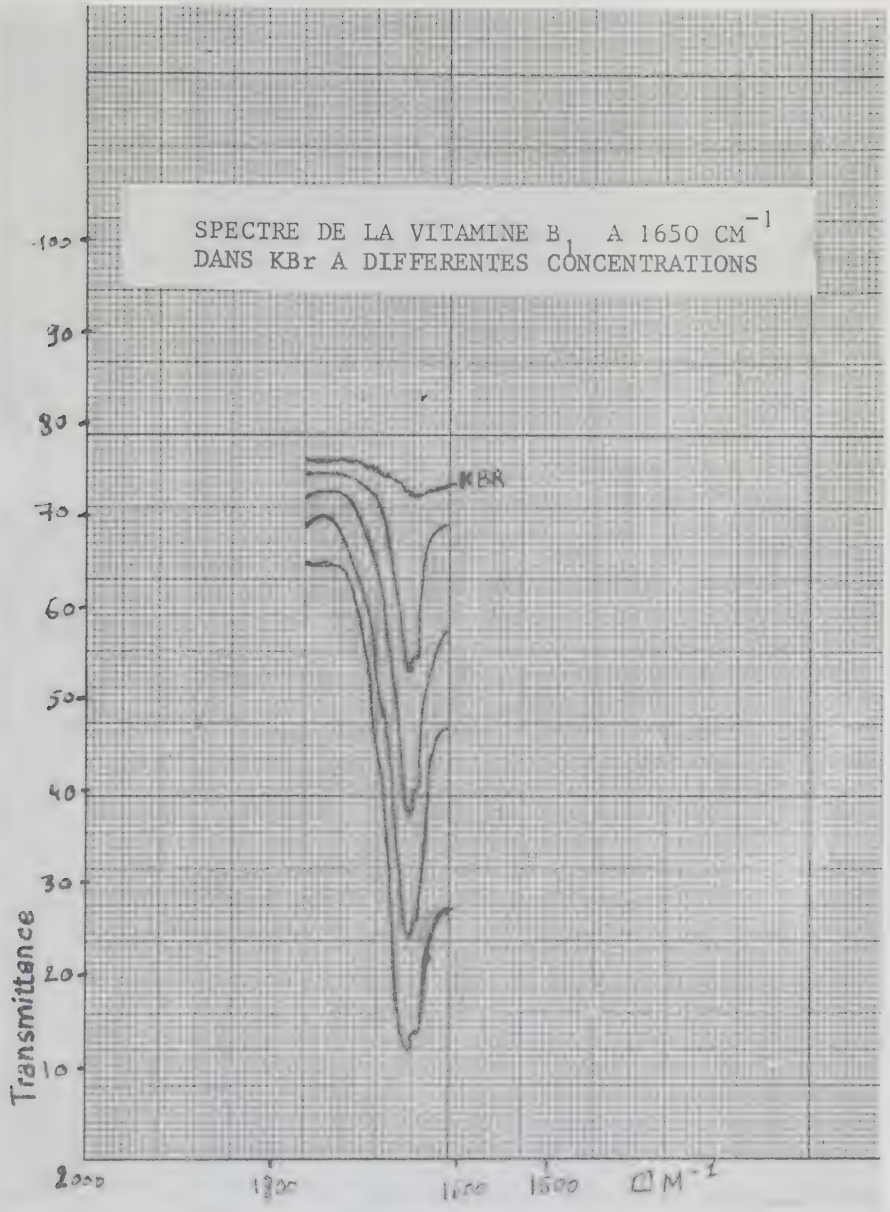
produit à déterminer à 1 650 cm^{-1} (figure 8). Le résultat est donné dans le tableau IV.

Tableau IV

Nom des spécialités	*Formes pharmac.*	*Composition*	*Vitamine B_1*	
			théorique	*trouvé*
Becozyme®	comprimés	chlorhydrate thiamine Riboflavine Nicotinamide Pyridoxine Pantothénate de Calcium	15 mg/comp.	14,1 mg/comp.

3°. Identification.

On compare le spectre de la substance étalon avec celui du produit à déterminer entre 250 cm^{-1} à 4 000 cm^{-1} (figure 9).



concentrations (µg)	1 500	1 000	700	300
D.O.	0,8	0,52	0,36	0,15

FIGURE 8

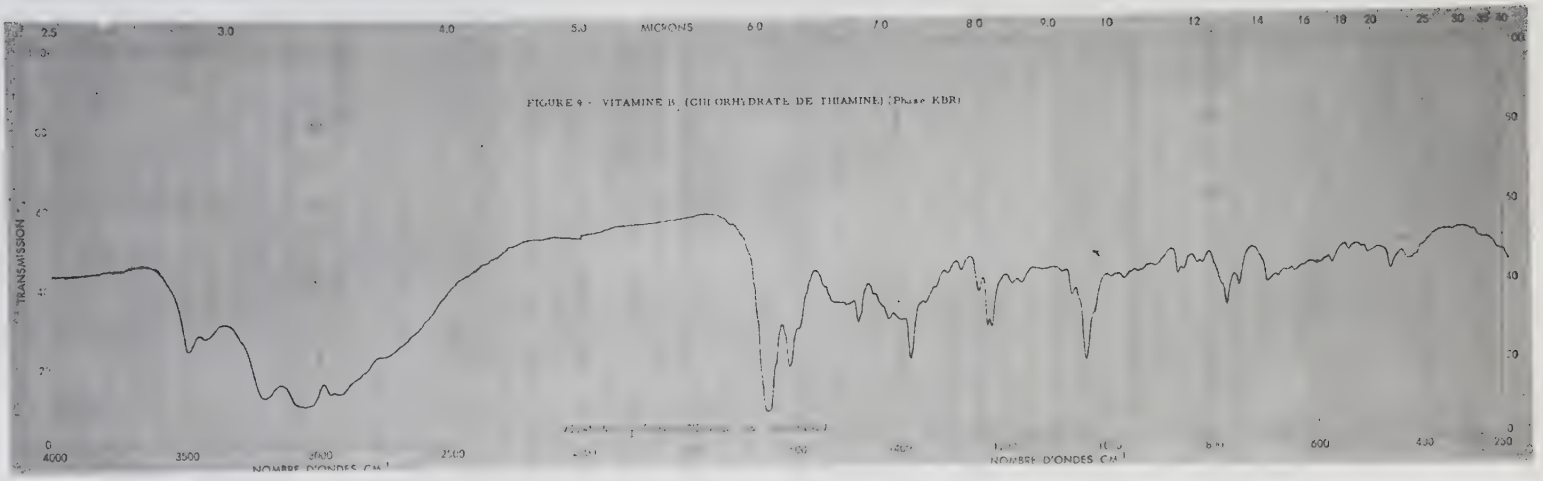


FIGURE 9 - VITAMINE B_1 (CHLORHYDRATE DE THIAMINE) (Phase KBr)

V. VITAMINE PP (NICOTINAMIDE).

Dosage.

Diverses méthodes ont été proposées pour le dosage du Nicotinamide (vitamine PP) dans les médicaments :

- les unes sont basées sur sa structure pyridique non substituée en α et α' de l'azote hétérocyclique. C'est le cas de la réaction de König au bromure de cyanogène (49, 68)
- d'autres mettent à profit l'hydrolyse alcaline de la fonction amide, l'ammoniac libéré est dosé par alcalimétrie (12, 73)
- il est également possible de provoquer un réarrangement de Hoffmann pour former l'amino-3 pyridine diazocopulable comme une amine aromatique. La réaction permet un dosage colorimétrique (28)
- enfin, dans certains cas, la spectrophotométrie dans l'ultra-violet est utilisable, le Nicotinamide présentant des maximums d'absorption à 210 nm, 220 nm et 260 nm.

Ces différents procédés ne sont pas dénués d'inconvénients, soit parce que leur mise en oeuvre est longue et délicate (réaction de König), soit parce que la spécifité est insuffisante (hydrolyse de la fonction amide), soit enfin parce qu'il intervient des interférences avec d'autres principes actifs associés, en particulier avec d'autres vitamines (diazocopulation, spectrophotométrie U.V.).

C'est la raison pour laquelle nous proposons une méthode par spectrophotométrie infra-rouge, simple et rapide.

1°. Principe.

La vitamine PP en solution chloroformique présente, dans la zone de 1 700 cm^{-1} un pic d'absorption dû à la fonction amide, alors qu'à cette même longueur d'onde le chloroforme est transparent. Ce pic est utilisable à des fins quantitatives. Le Nicotinamide, bien que peu soluble dans le chloroforme, l'est toutefois suffisamment pour que son extraction à partir des formes pharmaceutiques soit réalisable.

2°. Technique.

A. PREPARATION DE LA SOLUTION EXTRACTIVE.

La prise d'essai du médicament doit correspondre à environ 100 mg de Nicotinamide. L'extraction est réalisée très soigneusement, à chaud, par le chloroforme utilisé en trois fractions de 10 ml chacune. Après filtration pour éliminer les excipients et d'autres principes actifs insolubles, ou décantation dans le cas de préparations liquides, les solutés chloroformiques sont réunis, refroidis, puis le volume total est amené à 50 ml.

Ce procédé général est applicable aux comprimés, granulés, gélules et aux formes liquides du type hydrosol. Dans le cas des comprimés dragéifiés, il est nécessaire d'éliminer au préalable, l'enrobage par traitement à l'eau chaude. La seule pommade que nous ayons examinée comportait un excipient hydrosoluble dont il est facile de se débarrasser par filtration de la solution chloroformique après refroidissement.

B. DOSAGE.

La solution à essayer est injectée dans une cellule à NaCl et le spectre est déterminé sous une épaisseur de 0,4 mm. On détermine ensuite la densité optique par rapport à la ligne de base du chloroforme pur à 1 680 cm^{-1}.

Un étalonnage préalable est réalisé en déterminant les spectres de solutions chloroformiques de Nicotinamide pur de concentrations comprises entre 1 et 5 mg/l, limites dans lesquelles la loi de Beer-Lambert est respectée (figure 10). Pour des concentrations supérieures, la proportionalité n'est plus satisfaisante : en outre la limite de solubilité de la vitamine PP dans le chloroforme est rapidement atteinte.

3°. *Formes pharmaceutiques étudiées.*

Pour vérifier la validité de notre méthode, nous avons examiné diverses formes pharmaceutiques à base de vitamine PP : comprimés, comprimés dragéifiés, gélules, granulés, gouttes buvables, pommade. Le Nicotinamide en constituait l'unique principe actif ou bien était associé à d'autres médicaments.

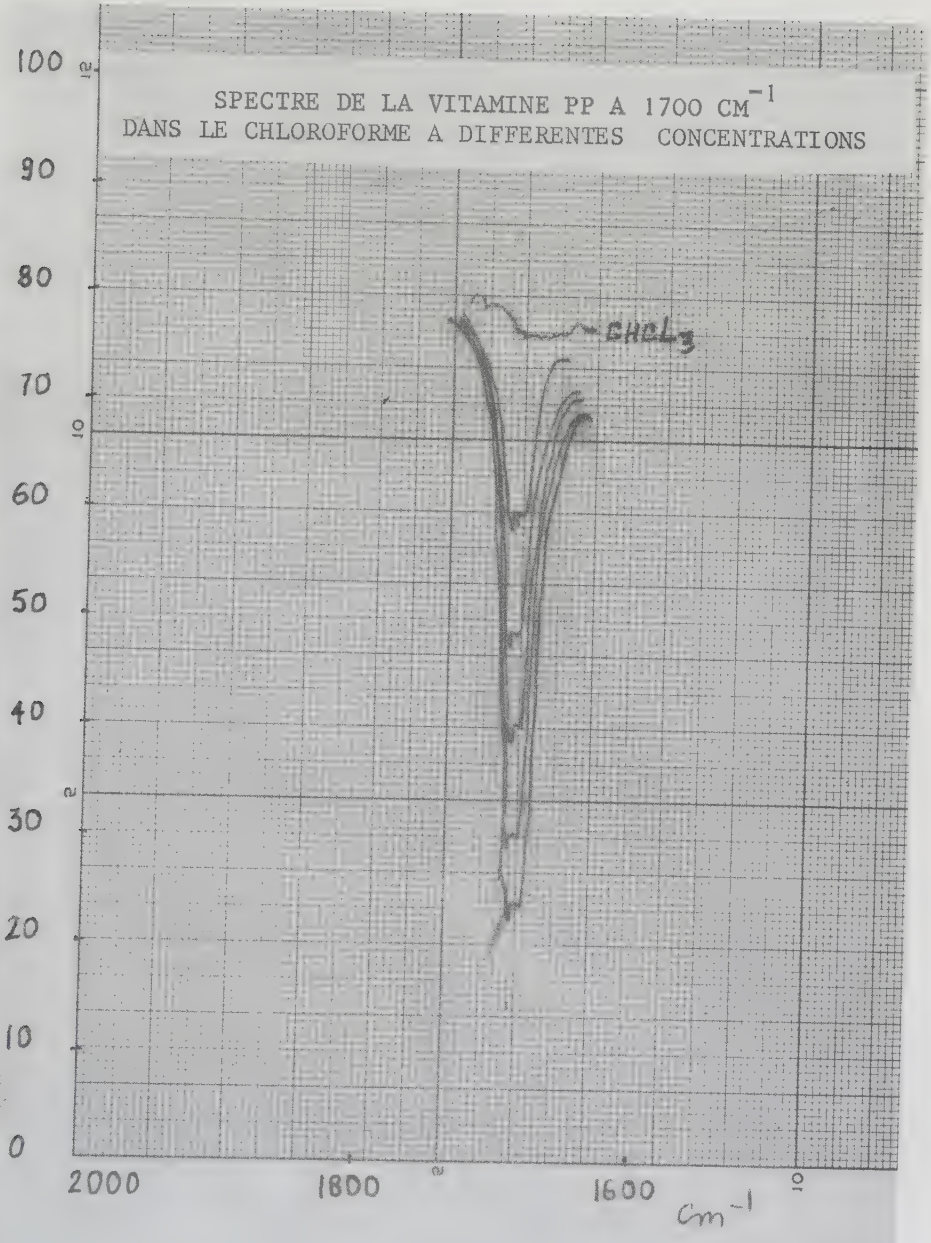
Tableau V

Nom des spécialités	*Forme pharmac.*	*Composants*	*Nicotinamide*	
			Théorique	*Trouvé*
Nicotinamide Spécia ®	comprimés	Nicotinamide	50 mg/comp.	49,5 mg/comp.
Nicobion ®	pommade	Nicotinamide	10 g/100 g	9,8 g/100 g
Nicobion-Aspirine ®	comprimés dragéifiés	Nicotinamide, acide acétyl salicylique	15 mg/comp.	14,5 mg/comp.
Codosoufryl ® Vitamine PP		Vitamine PP thiosulfate de Na, iodure de Na anhydre	5 g/100 ml	4,85 g/100 ml
Bécozyme ®	comprimés dragéifiés	Vitamines B_1, B_2, PP, B_6, Panthénol, Pantothénate de calcium	50 mg/comp.	49,5 mg/comp.
Dianavit ®	gélules	17α-méthyl 17β-hydroxyandrosta 1, 4-diène 3-one, axérophtol, vit. B_1, B_2, B_6, B_{12}, C, PP acétate de DL α-tocophérol	20 mg/gélule	19 mg/gélule
Flurimétavit ®	granulé	Vit. B_1, B_2, B_{12}, C, PP, Biotine, ac. pantothénique, Méthionine, ac. nucléinique, ac. glutamique	0,5 g/100 g	0,49 g/100 g
Hydrosol ® Polyvitaminé Roche	gouttes	Vit. A, B_1, B_2, B_5, B_6, PP, C, D_2, E	0,5 g/100ml	0,49 g/100 ml

Comme on peut le constater dans le tableau V, les résultats expérimentaux ont été satisfaisants et la précision de la méthode est compatible avec les exigences du contrôle des médicaments.

L'association Nicotinamide - Acide acétylsalicylique présente quelques particularités. Les deux principes actifs sont en effet solubles dans le chloroforme; en outre l'absorption de l'acide acétylsalicylique, dans la zone de 1 700 cm^{-1} est une cause d'interférences; pour l'éviter, il est nécessaire de séparer le Nicotinamide. On utilise dans ce but son hydrosolubilité, l'extrait aqueux étant ensuite évaporé à sec et repris par le chloroforme à chaud. L'acide acétylsalicylique reste insoluble lors de l'extraction aqueuse de la vitamine PP. Il peut d'ailleurs être ensuite dissous dans le chloroforme et dosé par spectrophotométrie I. R.

Il faut noter d'autre part, dans le cas de l'Hydrosol polyvitaminé, la présence de vitamines liposolubles, extraites par le chloroforme en même temps que la vitamine PP. Elles absorbent au voisinage du pic du Nicotinamide dans la région 1 700 cm^{-1}. Néanmoins le dosage reste possible, l'absorption du Nicotinamide provoquant un épaulement très visible (figure 11).



concentrations (mg)	5	4	3	2	1
D.O.	0,55	0,43	0,32	0,215	0,1

FIGURE 10

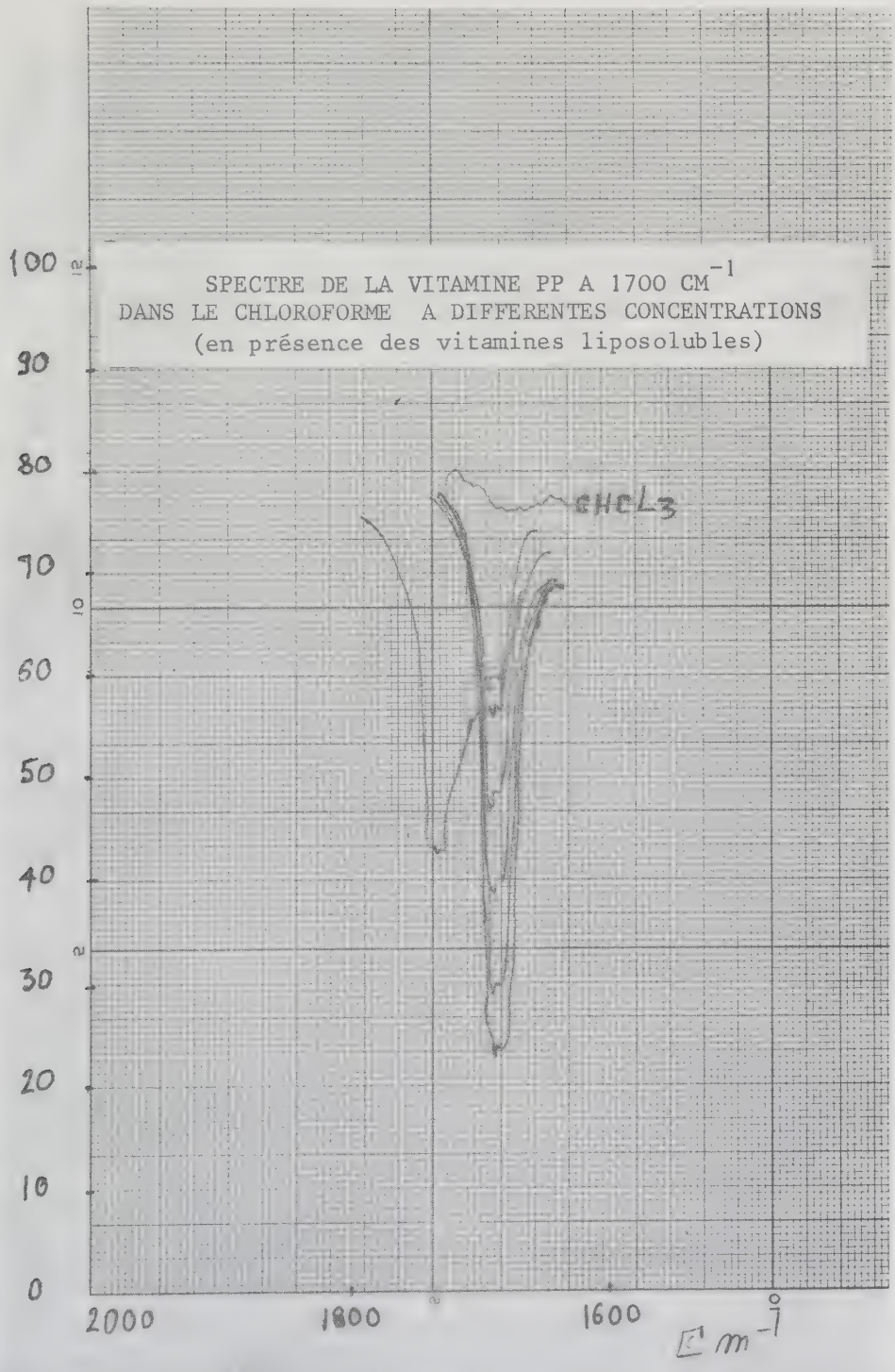

SPECTRE DE LA VITAMINE PP A 1700 CM^{-1}
DANS LE CHLOROFORME A DIFFERENTES CONCENTRATIONS
(en présence des vitamines liposolubles)
CHCl3
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
12
10
2
2000
1800
1600
cm^{-1}

FIGURE 11

C H A P I T R E I I

SULFAMIDES DIURETIQUES

IDENTIFICATION

Les sulfamides occupent une place prépondérante parmi les nombreux médicaments organiques et le nombre des dérivés synthétisés ne cesse de croître. Pour leur identification les méthodes chimiques donnent souvent des résultats globaux et non spécifiques.

Les méthodes chromatographiques, et surtout la chromatographie sur couche mince, sont intéressantes au point de vue qualitatif. La spectrophotométrie I. R. rend là encore de grands services.

Van DENBOSSCHE et coll. (74) ont employé la technique aux pastilles de bromure de potassium pour l'identification de produit pur : sulfaguanidine, sulfaméra-zine, sulfathiazol etc ...

Jacques CHOUTEAU et coll. (16) ont étudié quelques sulfamides à action prolongée.

BALOTESCU et coll. (4) ont appliqué la méthode à des mélanges de sulfamides.

MESLEY et coll. (45) ont envisagé la variation polymorphique des sulfamides par leur spectre I.R.

EDWARDS et coll. (24) ont déterminé le spectre I.R. de dix sulfamides en utilisant la méthode par réflexion totale atténuée et ils l'ont comparée au spectre de transmission.

Il n'y a pas de différence majeure entre les différents composés étudiés dans la position et allure du pic d'absorption. Il est possible d'utiliser la méthode A.T.R. pour l'identification du dérivé sodé du sulphacétamide dans les pommades ophtalmiques et les collyres.

Nous avons identifié quelques sulfamides diurétiques dans les médicaments par spectrophotométrie I.R.

I. PRINCIPE.

Les sulfamides diurétiques sont solubles dans l'acétone, qui permet de les extraire des formes pharmaceutiques. Parallèlement on prépare une solution acétonique du produit pur. Après évaporisation du solvant, on détermine les spectres I.R.

II. TECHNIQUE.

20 mg de produit pur est dissous dans 5 ml d'acétone (le volume du solvant dépend de la solubilité du sulfamide - Tableau VI). D'autre part, on traite un nombre de comprimés correspondant à 20 mg de principe actif par le même solvant.

Après filtration, on évapore les deux solutions.

1 à 2 mg de chaque résidu obtenu est mélangé intimement à 200 mg de KBr sec (séché pendant 24 h à 150°) et comprimé.

On examine en I.R. et on compare les spectres en sulfamide pur et du sulfamide extrait du médicament (on peut également partir d'une suspension du résidu dans le Nujol).

Nous avons identifié 11 sulfamides diurétiques dans 16 spécialités pharmaceutiques (Tableau VI).

Nous présentons d'une part dans la figure 13 le spectre de la Benzothiadiazine pur et celui des comprimés à la base de benzothiadiazine (il n'y a pas une différence majeure entre ces deux spectres). Et d'autre part dans la figure 12 A et 12 B les spectres de l'hydrochlorothiazide et du chlorothiazide. Ce changement au niveau de la double liaison explique leur différence.

Tableau VI

Nom des spécialités	*Formes Pharmac.*	*Composants*	*Solubilité dans l'acétone* *
Rénèse ®	comprimés	Polythiazide	+++
Rénèse R ®	-	Polythiazide, Réserpine	-
Fovane ®	-	Benzothiazide	++
Léodrine ®	-	Hydrofluméthiazide	++
Naturine-Leo ®	-	Bendrofluméthiazide	+++
Brinaldix ®	-	Clopamide	+++
Hygroton ®	-	Chlorthalidone	++
Aquedux ®	-	Monochlorphenamide	+++
Diurilix ®	-	Chlorothiazide	+
Diamox ®	-	Acétazolamide	++
Hygroton-Réserpine ®		Chlorthalidone, Réserpine	-
Esidrex ®	-	Hydrochlorothiazide	+++
Neptazane ®	-	Méthazolamide	+++
Esimil ®		Hydrochlorothiazide, Guanéthidine (hémisulfate)	-
Adelphan-Esidrex ® ®		Hydrochlorothiazide, Réserpine, Dihydralazine (sulfate)	-
Diupreskal ®		Chlorothiazide, Réserpine, cl K	-

* +++ : très soluble
++ : soluble (2-5 mg/ml)
+ : peu soluble (10 mg/ml)

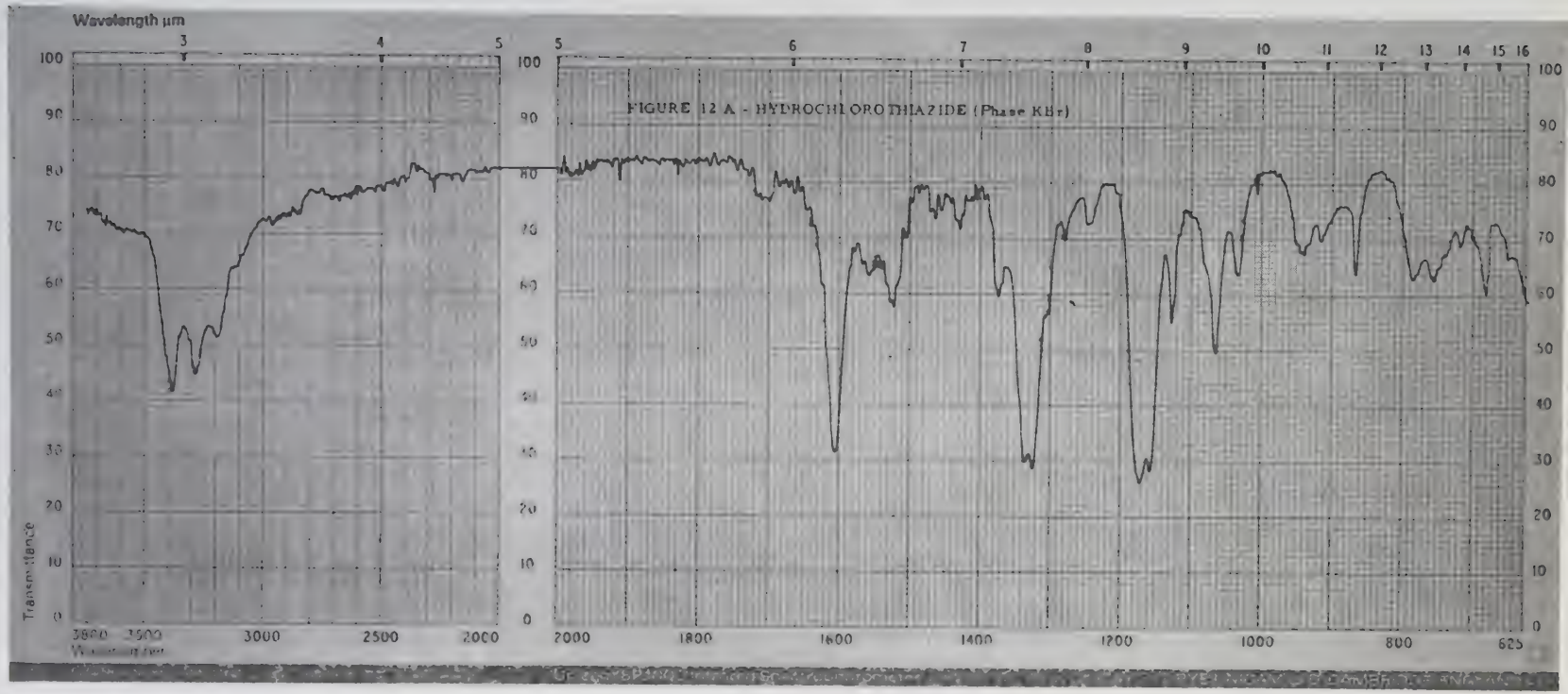


FIGURE 12 A - HYDROCHLOROTHIAZIDE (Phase KBr)

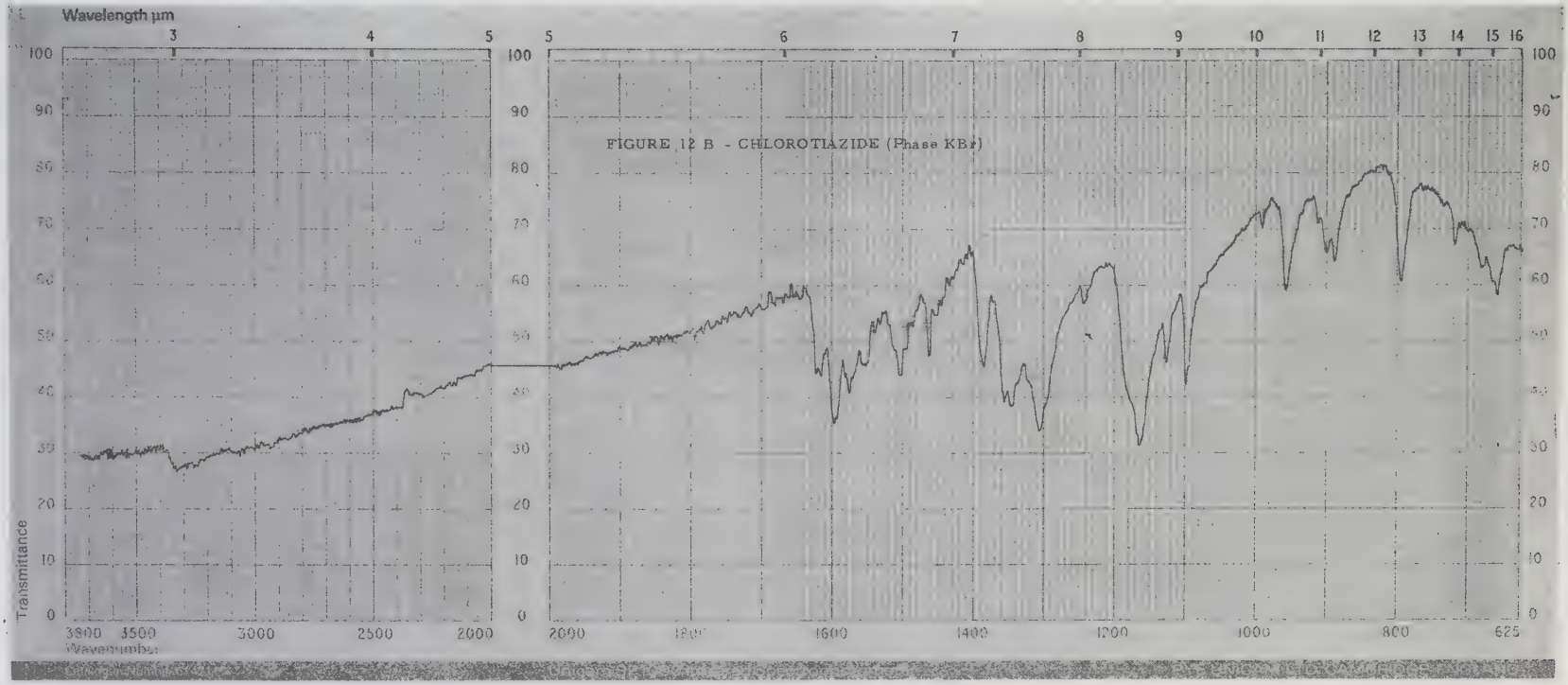


FIGURE 12 B - CHLOROTIAZIDE (Phase KBr)

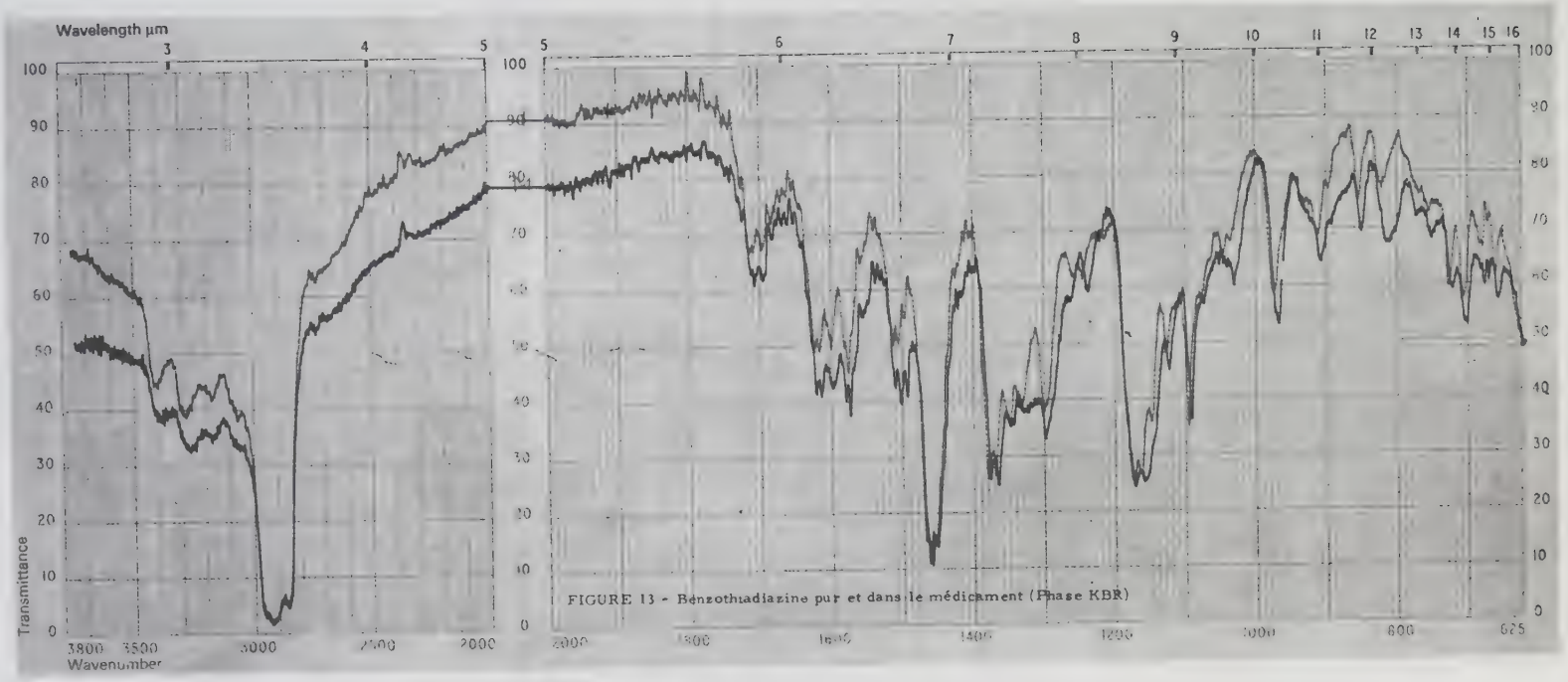


FIGURE 13 - Benzothiadiazine pur et dans le médicament (Phase KBR)

C H A P I T R E I I I

ALCALOÏDES ET BASES ORGANIQUES

IDENTIFICATION ET DOSAGE

Les alcaloïdes seuls ou en mélange constituent les principes actifs de nombreuses spécialités pharmaceutiques.

Outre les méthodes chimiques de dosages titrimétrique ou gravimétrique, la spectrophotométrie I. R. leur a été appliquée.

La littérature mentionne 22 alcaloïdes : codéine, morphine, atropine, cocaïne, papavérine etc ... Les spectres ont été mesurés dans le Nujol.

I. ALCALOÏDES DES SOLONACEES.

WASHBURN dose le sulfate d'atropine et le bromhydrate de scopolamine dans une pommade, par extraction préalable par le tétrachlorure de carbone après alcalinisation (77).

BROWNING et coll. (13) dosent ces mêmes alcaloïdes après compression avec KBr.

BRUCE et coll. (14) dosent le bromhydrate de scopolamine associé à d'autres principes actifs dans les comprimés.

II. ALCALOÏDE DU VERATRUM (53).

Les alcaloïdes isolés de Veratrum viride peuvent être distingués en deux groupes :

- ceux qui sont dépourvus d'activité hypotensive : Jervine, Rubijervine et Vératramine;
- hypotenseurs : Germerine, Germidine, Germitrine et Néogermitrine.

Ils sont caractérisés par la présence d'une fonction ester, dont l'absorption intense en I.R. à 1 740 cm^{-1} est dû à la double liaison du Carbonyl, il est valable aux points de vue qualitatif et quantitatif.

III. ALCALOÏDES DE L'OPIUM.

1°. Morphine et Codéïne.

Toutes les méthodes de dosage de la morphine et de la codéïne dans l'opium requièrent leur séparation. Certaines sont basées sur l'extraction liquide - liquide, d'autres sur la chromatographie; le dosage fait appel à la gravimétrie, la titrimétrie, la spectrophotométrie U.V., la chromatographie sur papier ou sur couche mince (élution des taches et dosage des éluats).

Ces deux alcaloïdes ont pu être dosés sans séparation préalable par spectrophotométrie I.R. (27) à la condition de les faire passer à l'état de dérivés acétylés, car la morphine est insoluble dans le tétrachlorure de carbone. La diacétylmorphine au contraire y est soluble. Aussi le mélange est-il traité par l'anhydride acétique qui conduit facilement aux dérivés acétylés (diacétylmorphine et diacétylcodéïne).

2°. Chlorhydrate de héroïne.

On peut identifier (46) le chlorhydrate héroïne par spectrophotométrie I. R.

IV. ALCALOÏDES ISOQUINOLEINIQUES.

Plusieurs publications ont trait à la détermination de la papavérine et de la narcotine en mélange. La plupart des méthodes imposent la séparation préalable des deux alcaloïdes.

Elle peut être évitée grâce à la spectrophotométrie I. R. (40). Le reinckate de narcotine est dosé à 1 760 cm^{-1}, alors que la papavérine n'absorbe pas dans cette région. On dose d'autre part la totalité des alcaloïdes par titration en milieu non aqueux.

De la différence entre les deux essais on déduit la quantité de papavérine.

BTARNE et coll. (15) ont étudié les mélanges de papavérine et de dihydrone (dihydro-hydroxy codéinone, eukodal) dans quelques préparations galéniques (ampoules, et suppositoires). Ils ne peuvent pas être facilement analysés par les méthodes autres que la spectrophotométrie I. R.

V. ALCALOÏDES DES QUINQUINAS.

Par suite de la similitude de structure entre la quinine et la quinidine d'une part, entre la cinchonine et la cinchonidine d'autre part, les spectres I.R. des deux isomères de chaque série en solution dans le sulfure de Carbone et ou dans le chloroforme sont très voisins. Donc a priori on ne peut pas étudier leur spectre I.R., mais grâce aux disques de bromure de potassium (30), on peut identifier et doser ces quatre alcaloïdes, cette méthode permettant d'apprécier le spectre dans les régions interdites par les solvants.

VI. ALCALOÏDES DU BULLE DE COLCHICIQUE.

La colchicine possède le squelette de la tropolone, cétone aromatique non benzénique à cycle heptagonal.

Plusieurs auteurs (37, 38) ont étudié son spectre I. R. qui comporte un pic d'absorption dans la région de 3 120 cm^{-1}.

VII. ALCALOÏDES MENISPERMACEES.

L'analyse (58) des alcaloïdes des ménispermacées et de leurs isomères (tétrandrine, isotétrandrine) a été réalisée par spectrophotométrie I.R.

VIII. ALCALOÏDES INDOLIQUES.

La spectrophotométrie I. R. a été appliquée à différents alcaloïdes indoliques (50) : réserpine, réserpiline, isoréserpiline, etc ...

Les spectres ont été obtenus dans le sulfure de Carbone et le chloroforme.

Elle a permis à WARREN et coll. (76) d'identifier 23 alcaloïdes indoliques.

Reprenant ces travaux nous avons dosé et identifié la réserpine dans des comprimés.

1°. Principe.

La réserpine en solution chloroformique présente trois pics d'absorption à 1 330 cm^{-1}, 1 130 cm^{-1}, et 1 715 cm^{-1}, pour lesquels la loi de Beer-Lambert est vérifiée à des concentrations variant entre 30 mg/ml et 2,7 mg/ml sous une épaisseur 0,4 mm.

2°. *Technique.*

A. DOSAGE.

On dissout 750 mg de réserpine dans 25 ml de chloroforme (solution à 30 mg/ml) à partir de laquelle on prépare une gamme entre 2,7 mg/ml et 30 mg/ml. On introduit par ordre décroîssant chaque dilution dans la cellule à I.R. On lit la hauteur du pic à partir de la ligne de base de chloroforme dans les trois régions indiquées : 1 330 cm^{-1}, 1130 cm^{-1}, 1 715 cm^{-1} (dans ces conditions le chloroforme est transparent) (figures 14, 15, 16).

On remarque d'une part dans la figure 14, 15 16 que, pour une même concentration, la densité optique est plus forte à 1 130 cm^{-1} qu'à 1 330 cm^{-1}, plus forte à 1 330 cm^{-1} qu'à 1 715 cm^{-1}.

D'autre part l'allure de la courbe est beaucoup plus fine à 1 130 cm^{-1} et 1 330 cm^{-1} qu'à 1 715 cm^{-1}; le dosage est donc beaucoup plus précis à ces deux longueurs d'ondes.

Dans le cas où la réserpine est mélangée à d'autres substances solubles dans le chloroforme, on choisit la longueur d'onde à laquelle l'absorption de l'alcaloïde n'est pas perturbée.

B. IDENTIFICATION.

2 à 4 ml de solution chloroformique sont évaporées à sec; 1 à 2 mg de résidu est pastillé avec 200 mg de KBr. On détermine le spectre entre 625 cm^{-1} et 3 800 cm^{-1} (figure 17).

3°. Applications aux comprimés.

A. DOSAGE.

On part d'un nombre de comprimés correspondant à 10 mg de réserpine. Ils sont finement pulvérisés au mortier, traités par deux fois 10 ml du chloroforme; on filtre, le filtrat est évaporé à sec; le volume est ramené à 1 ml.

On continue comme précédemment.

Remarque.

Etant donné la faible concentration de l'alcaloïde dans les comprimés, afin de diminuer la prise d'essai, nous avons ramené le volume de notre dilution à 1 ml.

Le tableau VII rend compte de nos résultats.

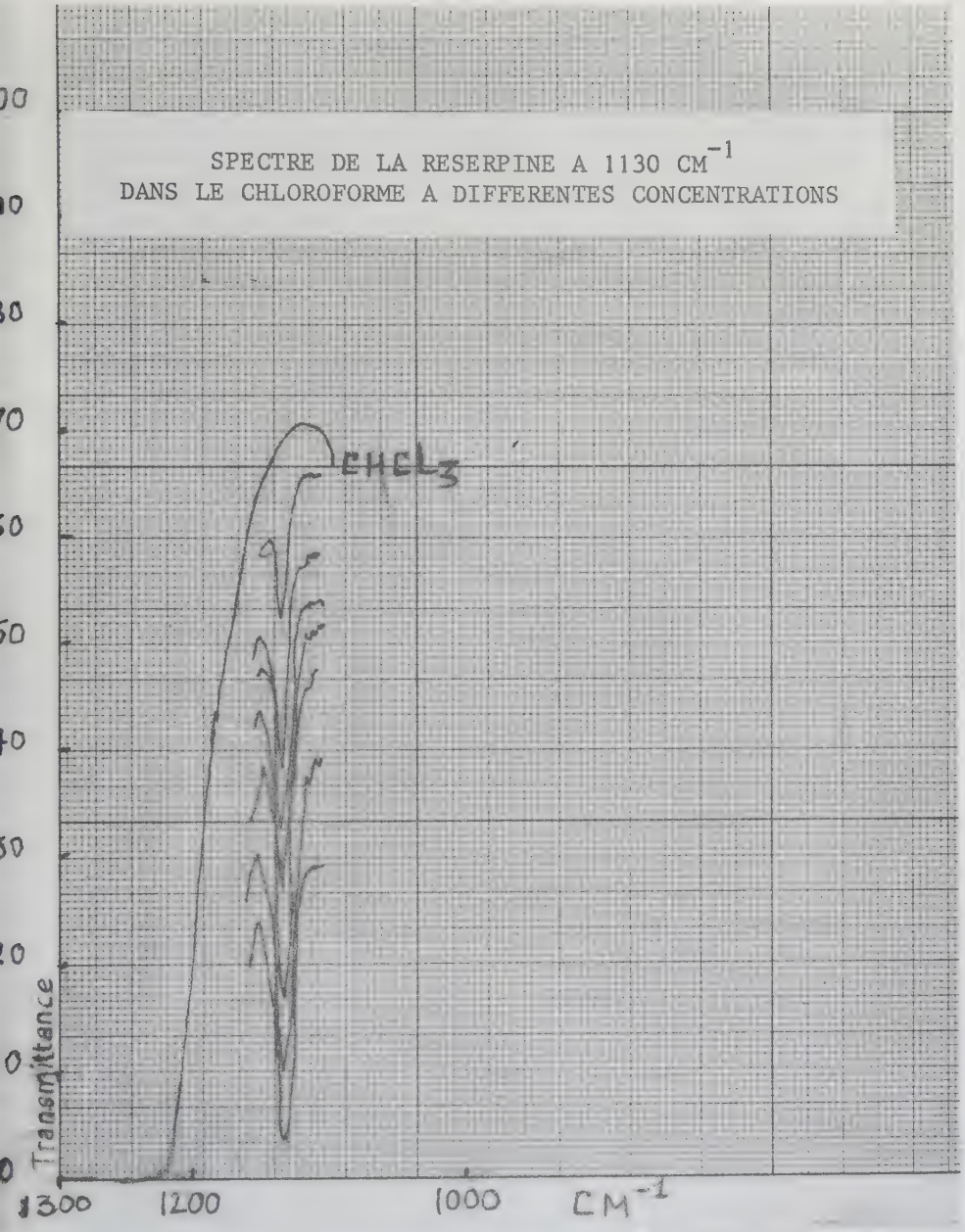
Tableau VII

Nom des spécialités	*Formes pharmac.*	*Composants*	*Réserpine*	
			théorique	*trouvé*
Réserpine Chanterau Ⓡ	comprimés	réserpine	1 mg/comp.	0,95 mg/comp.

B. IDENTIFICATION.

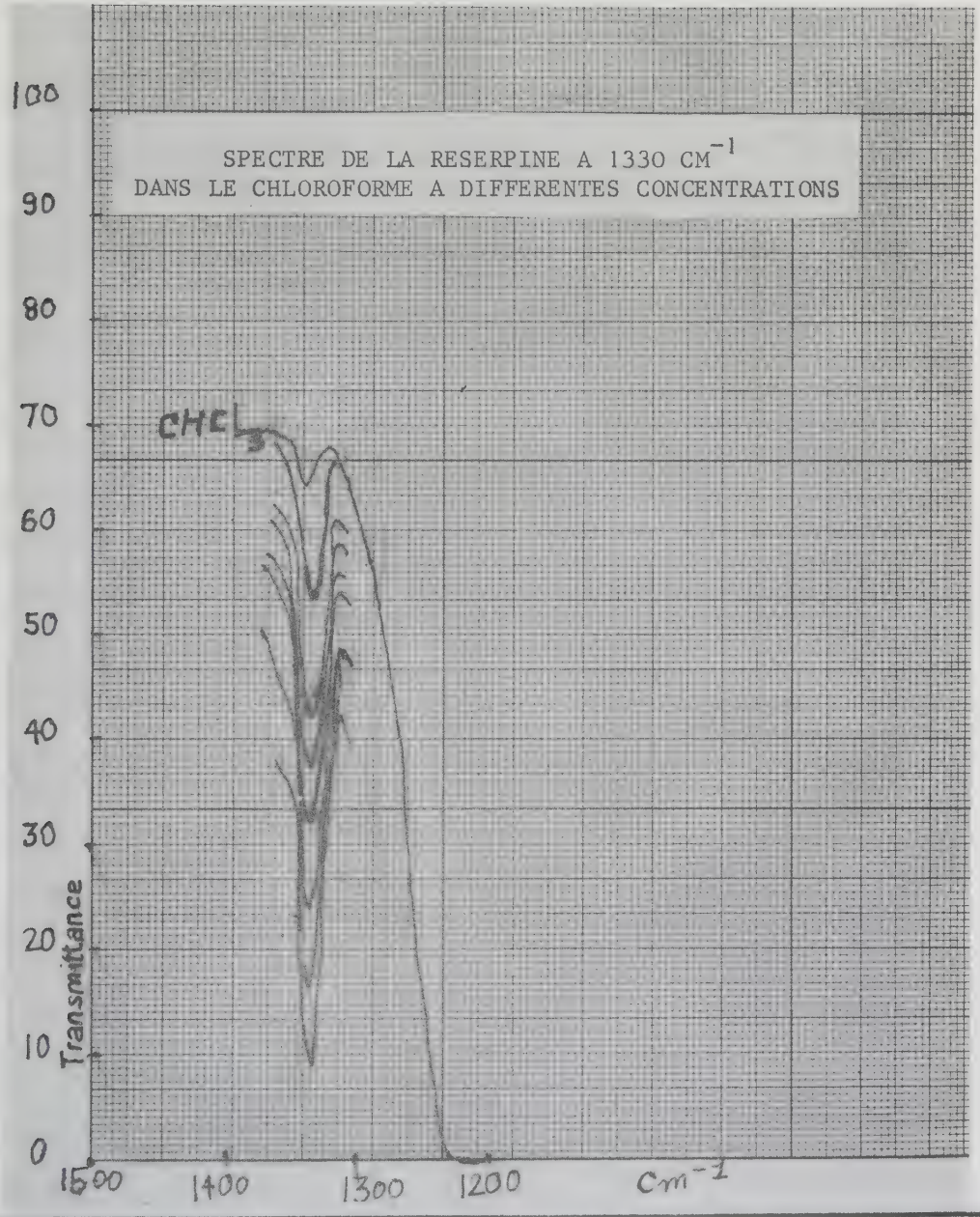
On pulvérise au mortier un nombre de comprimés correspondant à 5 à 8 mg de réserpine.

On traite par 2 fois 10 ml de chloroforme, filtré; le filtrat est évaporé à sec; on continue comme il a été indiqué.



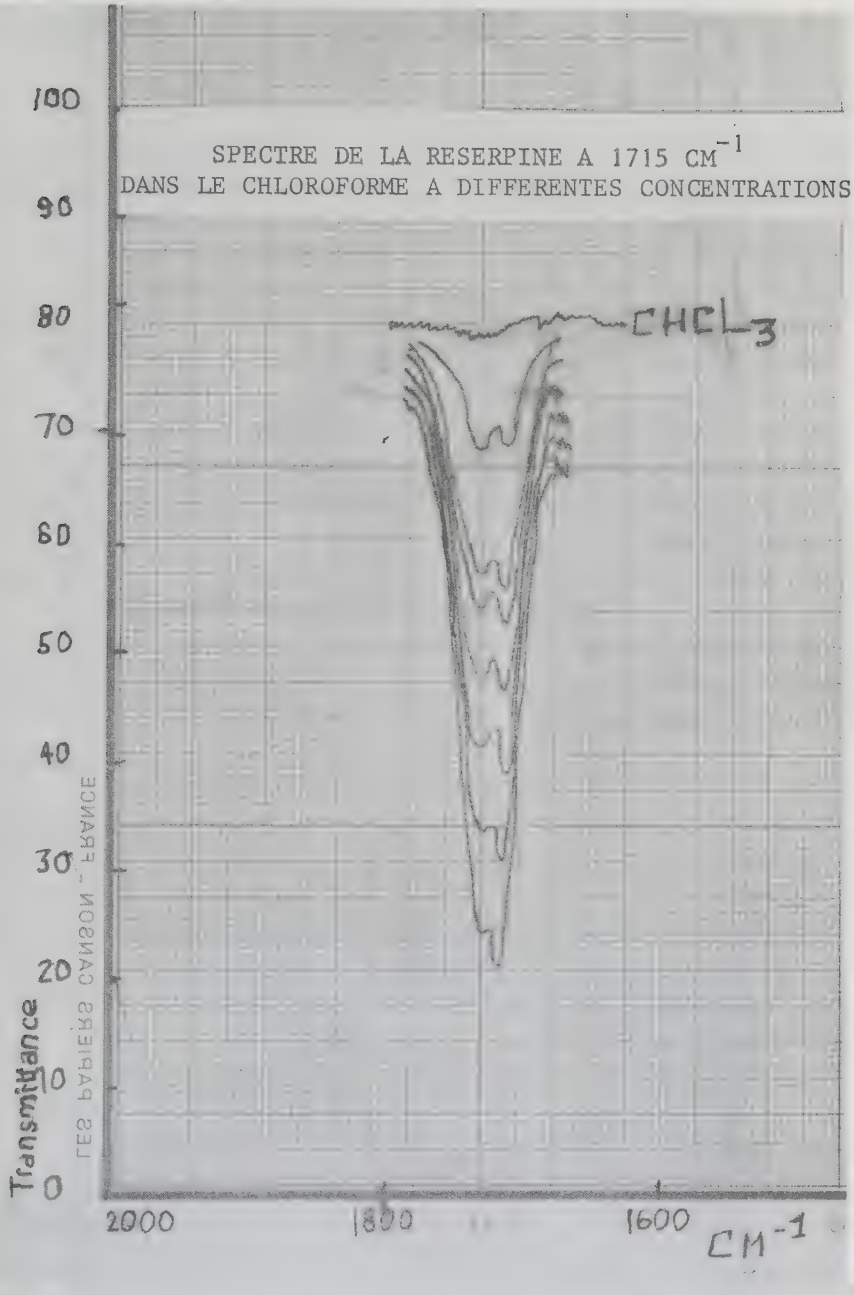
centrations (mg)	30	20	15	10	7,5	4,3	2,7
D.O.	1,3	0,84	0,62	0,42	0,33	0,18	0,11

FIGURE 14



concentrations (mg)	30	20	15	10	7,5	4,3	2,7
D.O.	0,88	0,60	0,44	0,30	0,22	0,12	0,08

FIGURE 15



concentrations (mg)	30	20	15	10	7,5	4,3	2,7
D.O.	0,62	0,41	0,31	0,21	0,16	0,09	0,05

FIGURE 16

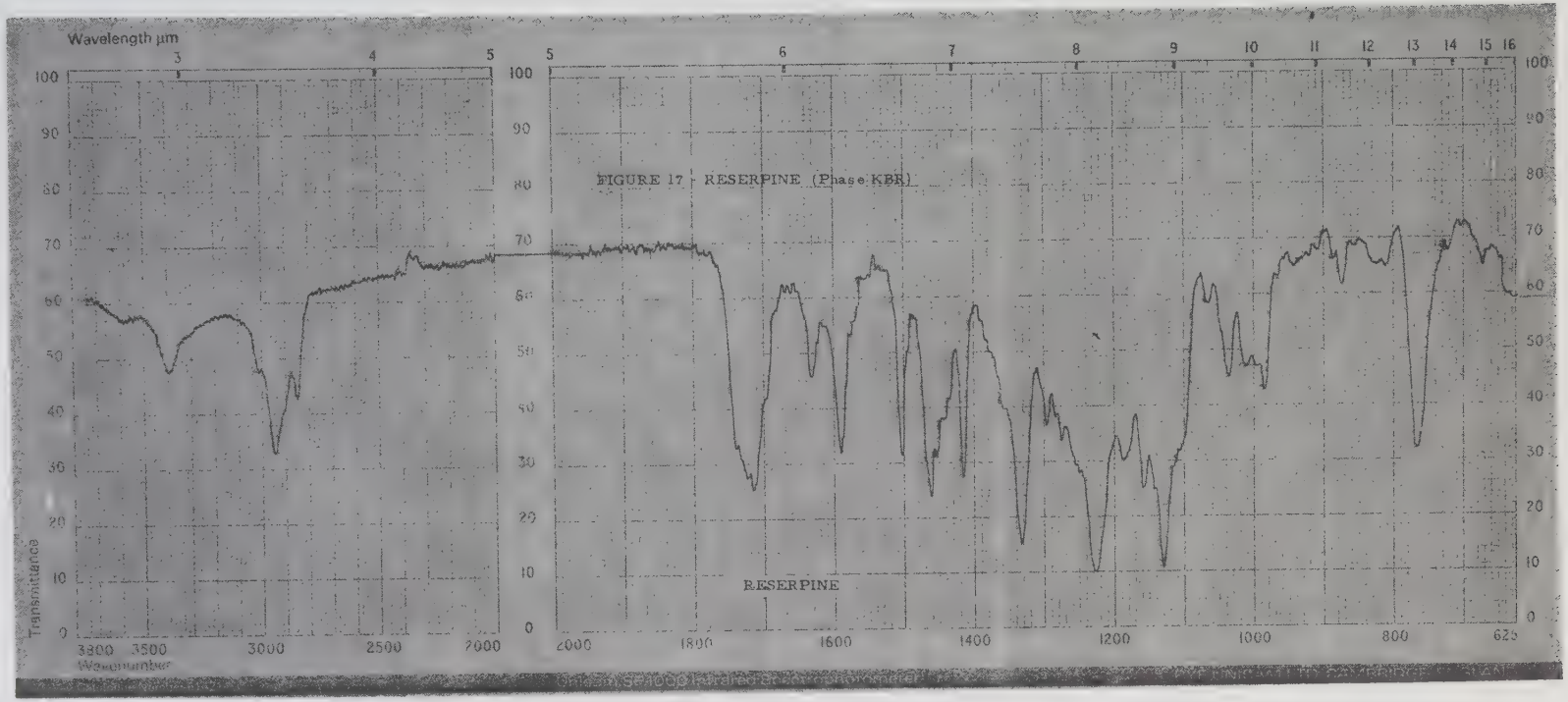


FIGURE 17 - RESERPINE (Phase KBR)

IX. IDENTIFICATION ET DOSAGE DU TARTRATE D'ERGOTAMINE, DU METHANESULFONATE DE DIHYDROERGOTAMINE, DU METHANESULFONATE DE DIHYDROERGOTOXINE.

Nous avons appliqué la spectrophotométrie I.R. à l'identification et au dosage des sels d'alcaloïdes de l'ergot ou de leurs dérivés dans les médicaments :

- tartrate d'ergotamine
- méthanesulfonate de dihydroergotoxine
- méthanesulfonate de dihydroergotamine.

1°. Dosage.

Le dosage est pratiqué sur une solution chloroformique de la base préalablement extraite à partir de son sel en milieu alcalin.

On met à profit l'absorption à deux fréquences, 1 660 cm^{-1} et 1 740 cm^{-1}. La loi de Beer-Lambert est vérifiée pour une concentration variant entre 3,5 mg/ml et 12 mg/ml.

A. PREPARATION DE LA SOLUTION ETALON.

On introduit 120 mg de sel dans une ampoule à décantation.

On ajoute 25 ml d'eau distillée, 240 mg de carbonate acide de sodium, puis, en agitant doucement, 15 ml de chloroforme pur. On poursuit l'agitation puis on laisse reposer.

On recueille la phase chloroformique; on recommence l'extraction avec trois fois 7 ml de chloroforme. Les solutions chloroformiques sont réunies, lavées deux ou trois fois avec 15 ml d'eau distillée en vue d'obtenir une solution limpide rigoureusement privée d'impuretés pouvant exister sous forme de suspensions qui pourraient modifier le spectre d'absorption.

La solution chloroformique purifiée est évaporée à sec; le résidu est pris par 10 ml de solvant. On obtient donc une solution contenant 12 mg/ml de chacun des sels. Elle permet la préparation d'une gamme de concentration variant entre 3 mg/ml et 12 mg/ml.

B. APPLICATIONS AUX MEDICAMENTS.

Nous avons identifié et dosé les trois composés dans les médicaments suivants :

1) comprimés de tartrate d'ergotamine
2) soluté de méthanesulfonate de dihydroergotamine
3) comprimés contenant du méthanesulfonate de dihydroergotoxine et du clopamide
4) comprimés contenant du tartrate d'ergotamine, les alcaloïdes totaux de la Belladone et du Phénobarbital.

a. Cas des médicaments ne contenant que du tartrate d'ergotamine ou du méthanesulfonate de dihydroergotamine.

On part d'une quantité de médicament correspondant à 5 à 6 mg de principe actif (les comprimés sont bien entendu finement pulvérisés). On ajoute 20 ml d'eau distillée, 10 à 12 mg de carbonate acide de sodium, puis, en agitant, 15 ml de chloroforme pur. On poursuit l'agitation doucement afin d'éviter la formation d'une émulsion (au cas où il s'en produirait on ajouterait quelques ml de chloroforme). On sépare la solution chloroformique de la base et on refait l'extraction par trois fois 10 ml de chloroforme. On réunit les solutions. On lave avec deux fois 10 ml d'eau.

Par suite de la faible quantité de chacun des sels dans les médicaments étudiés et pour éviter la mise en oeuvre de prises d'essais importantes, on doit opérer sur 1 ml de solution chloroformique. Dans un premier temps, nous avons évaporé totalement le chloroforme

et nous avons repris le résidu par 1 ml de solvant; mais la dissolution est difficile et il faut éviter une évaporation ultérieure.

Nous préfèrons opérer de façon suivante : la solution chloroformique purifiée par lavage à l'eau est évaporée partiellement de façon à obtenir 4 ml environ que l'on introduit dans un flacon de 5 ml. On évapore à sec au bain-marie. On adapte sur le flacon un bouchon de caoutchouc.

On introduit 1 ml de chloroforme au moyen d'une seringue. Le résidu est dissout par agitation; on retire la solution et on l'introduit dans une cellule à NaCl du spectrophotomètre I.R. (figure 18). On examine sous une épaisseur de 0,4 mm. On détermine la densité optique à 1660 cm^{-1} et 1740 cm^{-1} par rapport à la ligne de base du chloroforme pur. On compare avec la gamme étalon (figure 19).

b. Cas des comprimés à plusieurs composants.

Pour le mélange méthanesulfonate de dihydroergotamine-clopamide, ce dernier est insoluble dans le chloroforme et ne gêne pas donc le dosage et l'identification.

Dans le cas de l'association tartrate d'ergotamine - alcaloïde totaux de la belladone, phénobarbital, on commence par éliminer les principes solubles dans le chloroforme; le résidu, constitué par le tartrate d'ergotamine, est traité comme il a été indiqué.

2°. Identification.

La solution chloroformique est évaporée. On mélange 1 à 2 mg de résidu avec 100 mg de KBr sec. On examine après compression. Pour le produit pur il est possible d'effectuer la compression 1 à 2 mg du sel lui-même, sans passer par l'intermédiaire de la base.

Les spectres d'absorption des trois bases sont donnés (figure 20 A, 20 B, 20 C), ceux des sels (figure 21 A, 21 B, 21 C). Les trois sels présentent un spectre différent de celui de leur base.

Nos résultats sont rassemblés dans le tableau VIII.

Tableau VIII

Nom des spécialités	*Formes pharmac.*	*Composants*	*Résultats*	
			théorique	*trouvé*
ergène ®	comprimés	tartrate d'ergotamine	1 mg/comp.	0,95mg/comp.
ydroergota-e Sandoz ®	solutés	méthane sulfonate de dihydroergotamine	200 mg/ 100 ml	195 mg/ 100 ml
naldix ®	comprimés	.méthane sulfonate de dihydroergotoxine, .clopamide	1,64 mg/ comp.	1,115 mg/ comp.
lergal ®	comprimés	.tartrate d'ergotamine .alcaloïdes totaux de belladone .phénobarbital	0,3 mg/ comp.	0,28 mg/ comp.

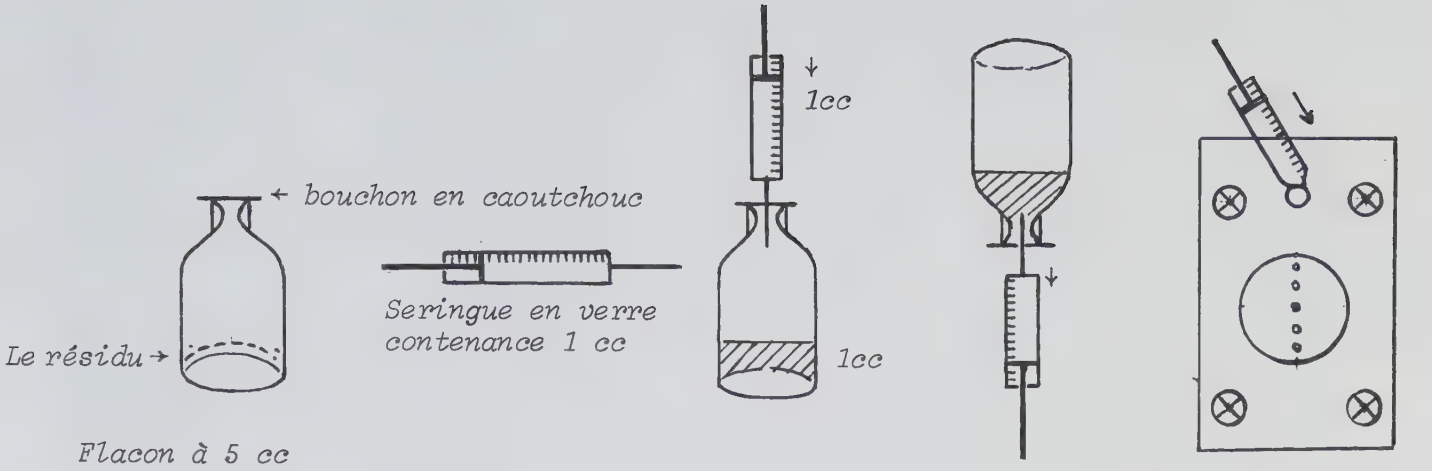
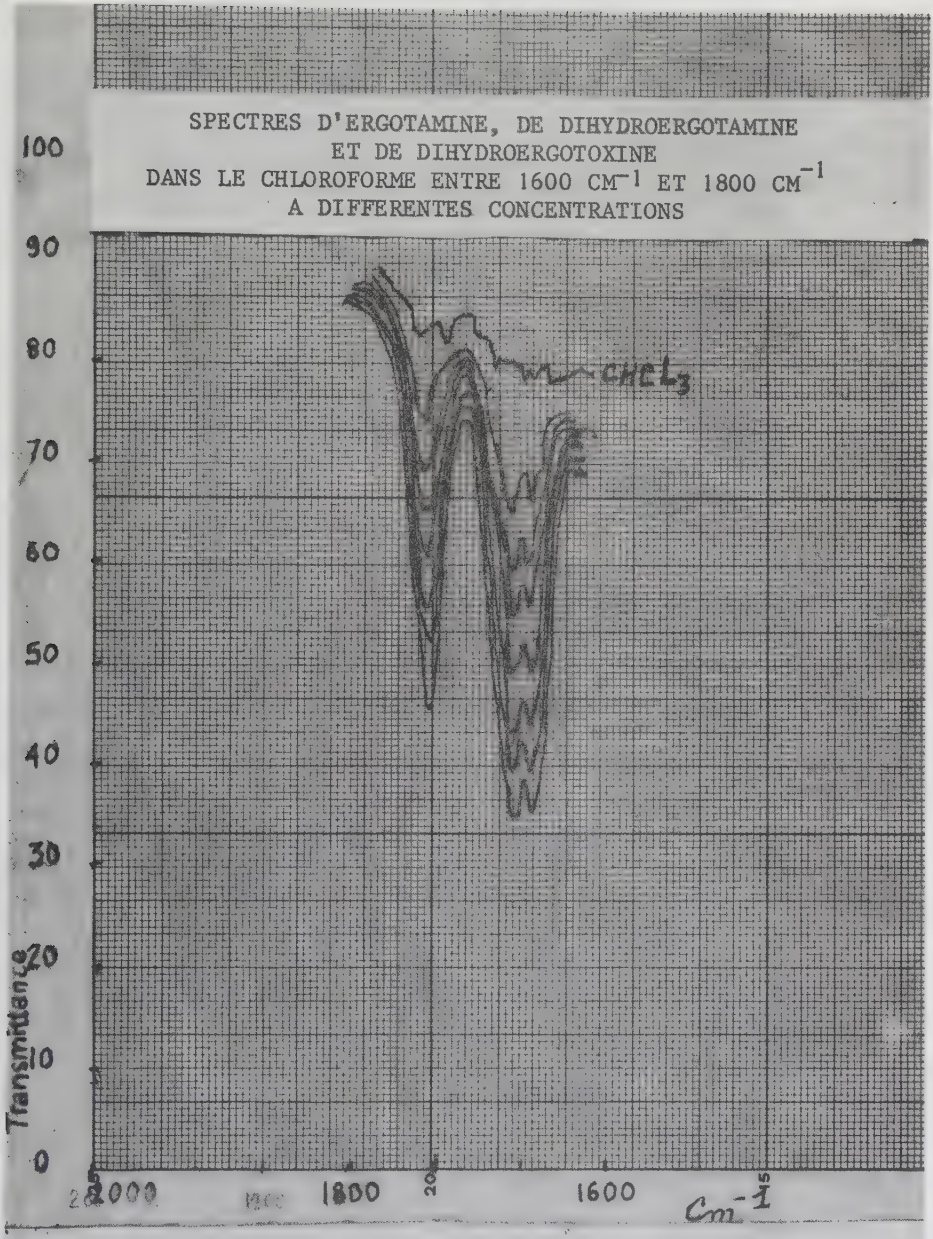

bouchon en caoutchouc
Le résidu
Seringue en verre
contenance 1 cc
1cc
1cc
Flacon à 5 cc
La cellule à l'I.R.
(I)
(II)
(III)
(IV)

Figure 18

SPECTRES D'ERGOTAMINE, DE DIHYDROERGOTAMINE
ET DE DIHYDROERGOTOXINE
DANS LE CHLOROFORME ENTRE 1600 CM^{-1} ET 1800 CM^{-1}
A DIFFERENTES CONCENTRATIONS



concentrations (mg)	12	10	8,5	6	5	3,5
D.O. à 1660 cm^{-1}	0,40	0,34	0,29	0,21	0,17	0,12
D.O. à 1740 cm^{-1}	0,241	0,20	0,17	0,12	0,1	0,7

FIGURE 19

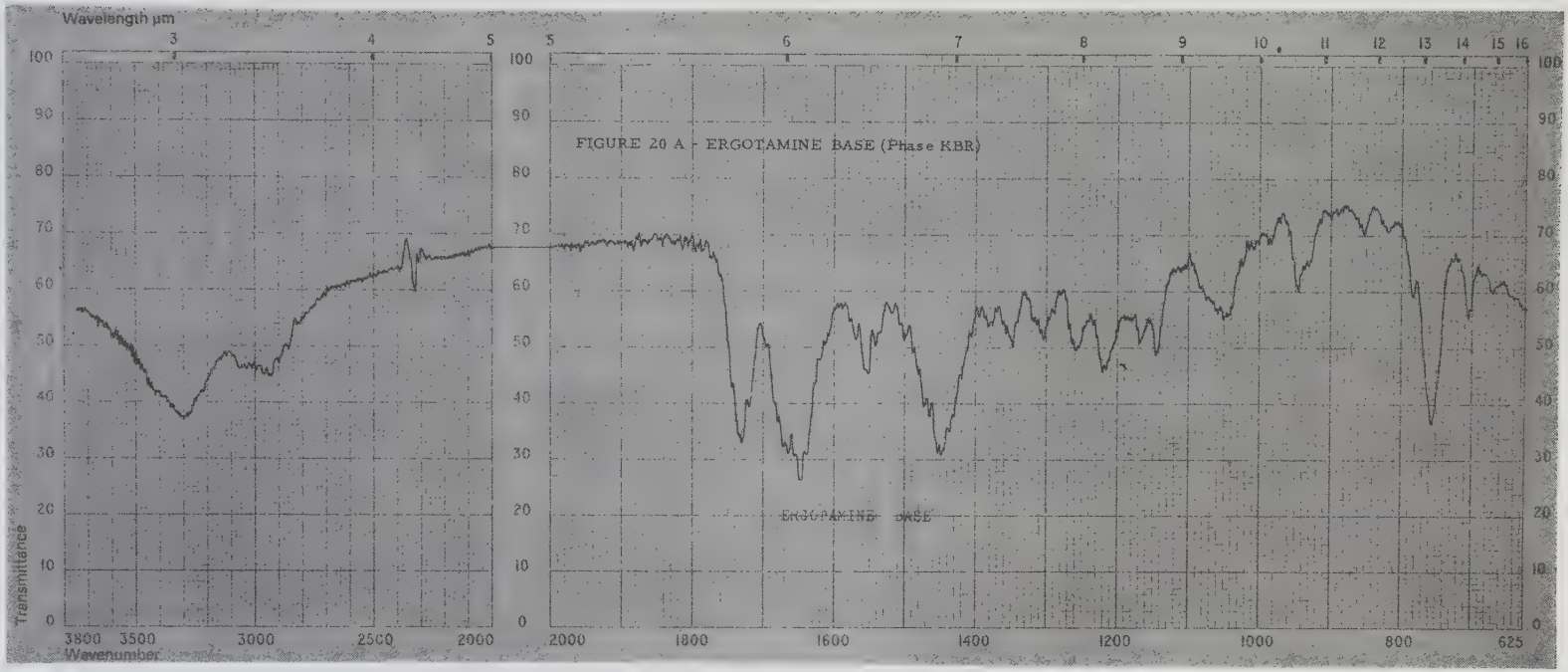


FIGURE 20 A - ERGOTAMINE BASE (Phase KBR)

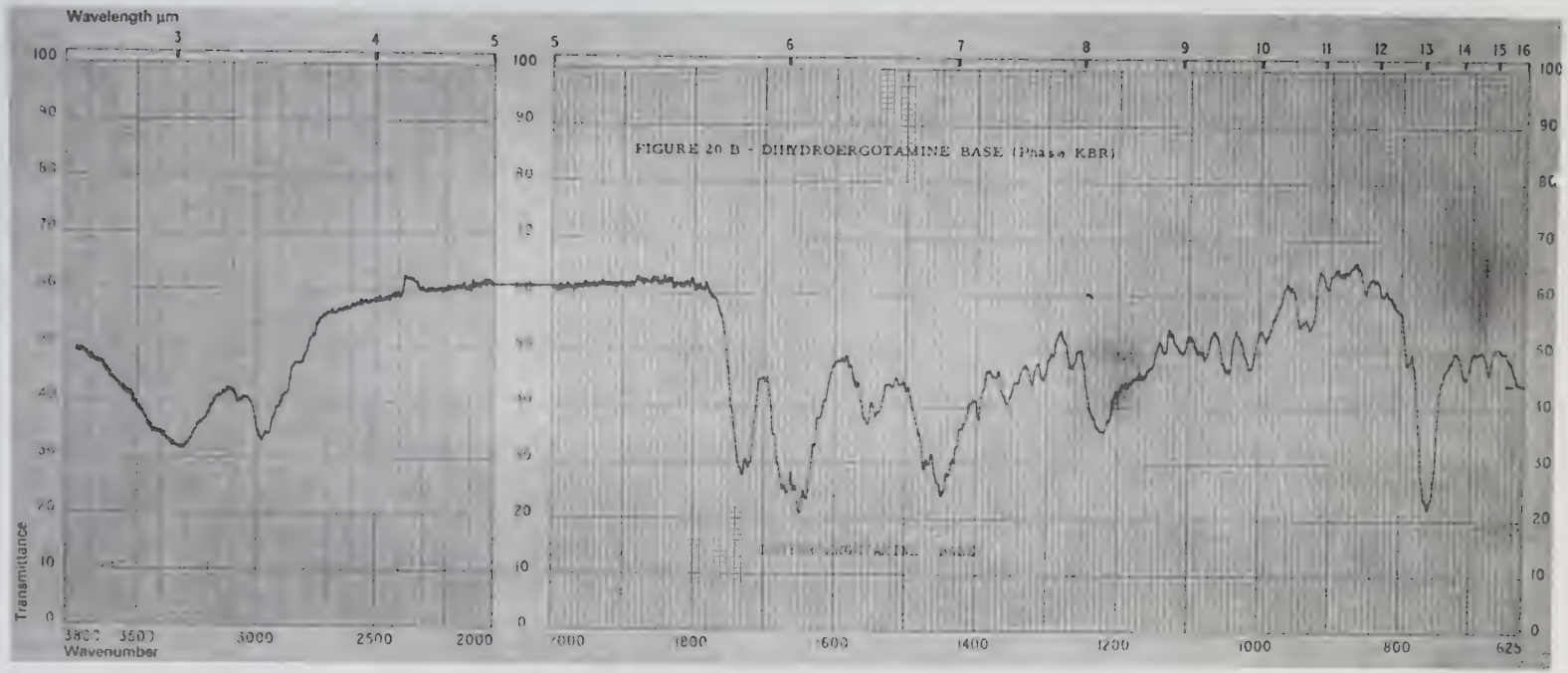


FIGURE 20 B - DIHYDROERGOTAMINE BASE (Phase KBR)

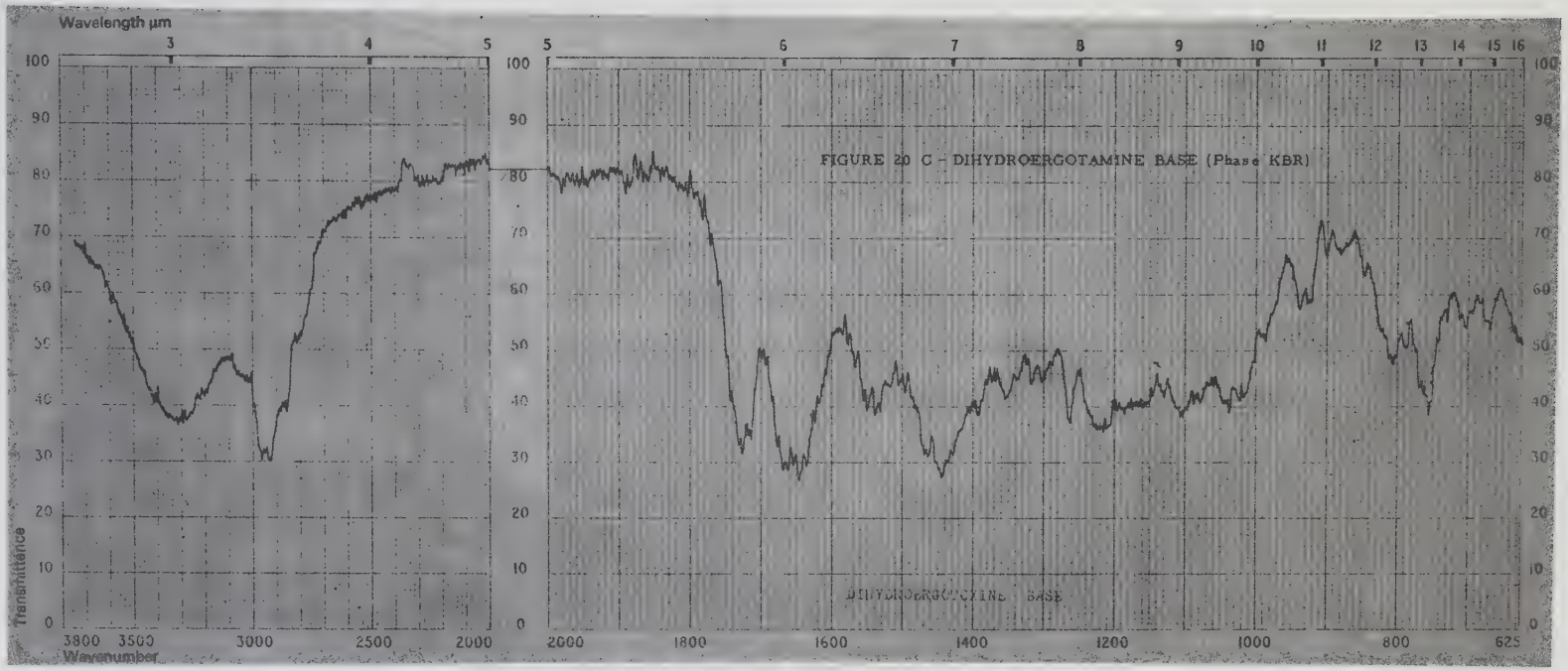


FIGURE 20 C - DIHYDROERGOTAMINE BASE (Phase KBR)

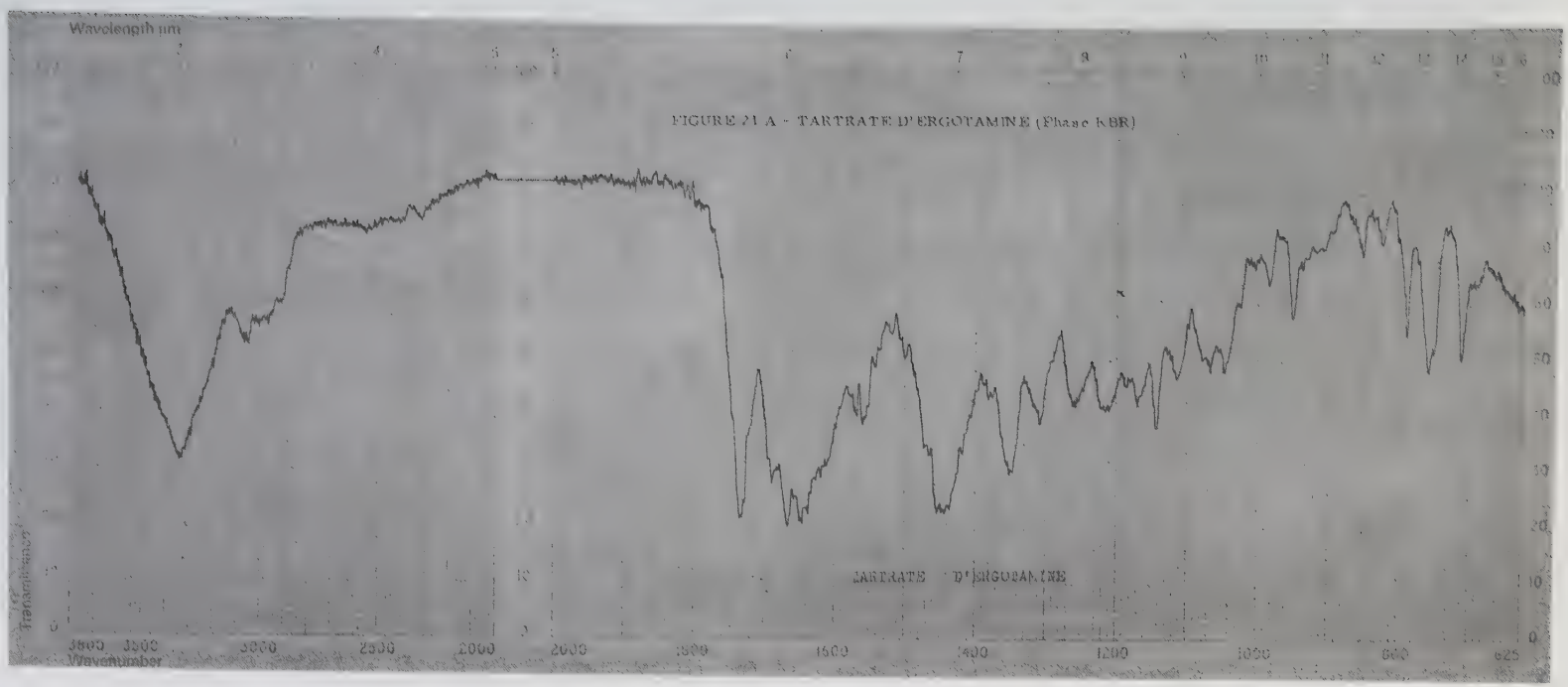


FIGURE 21 A - TARTRATE D'ERGOTAMINE (Phase KBR)

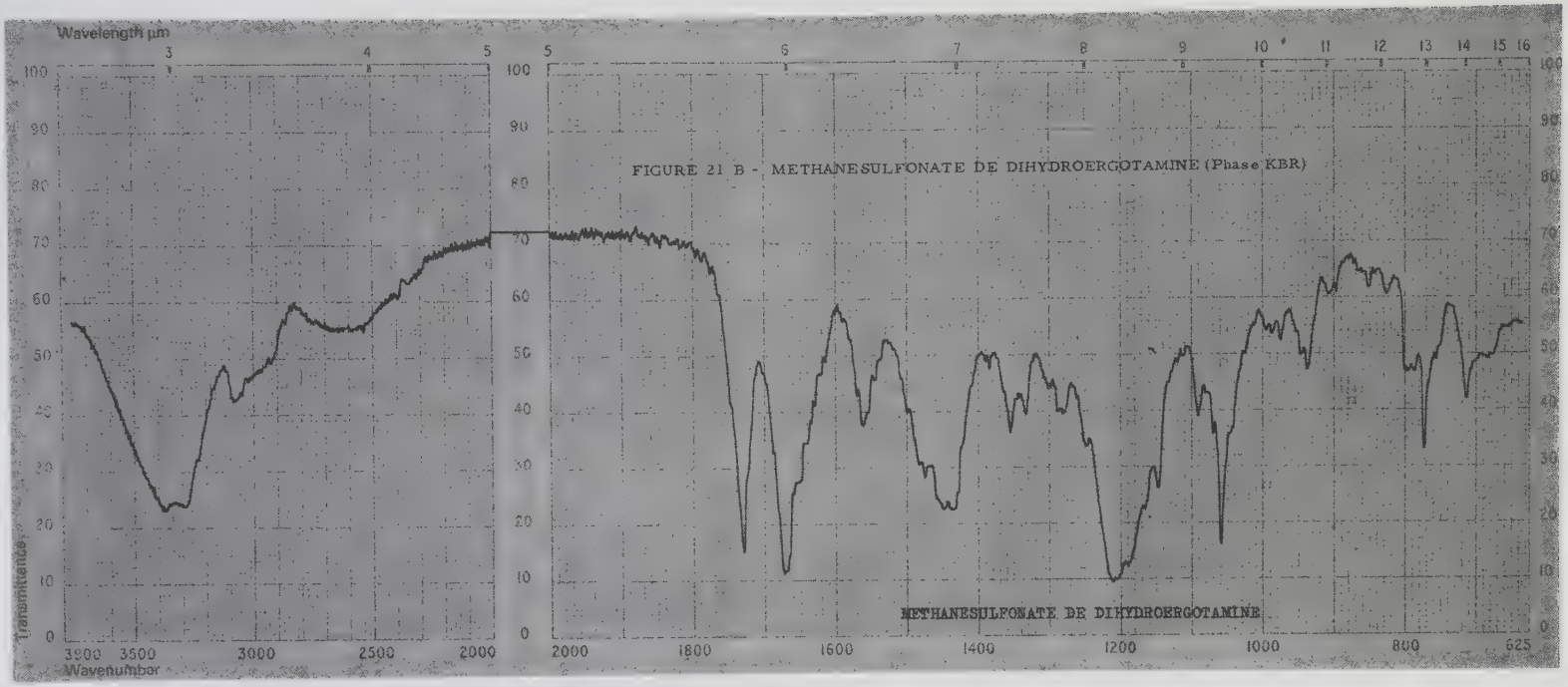


FIGURE 21 B - METHANESULFONATE DE DIHYDROERGOTAMINE (Phase KBR)

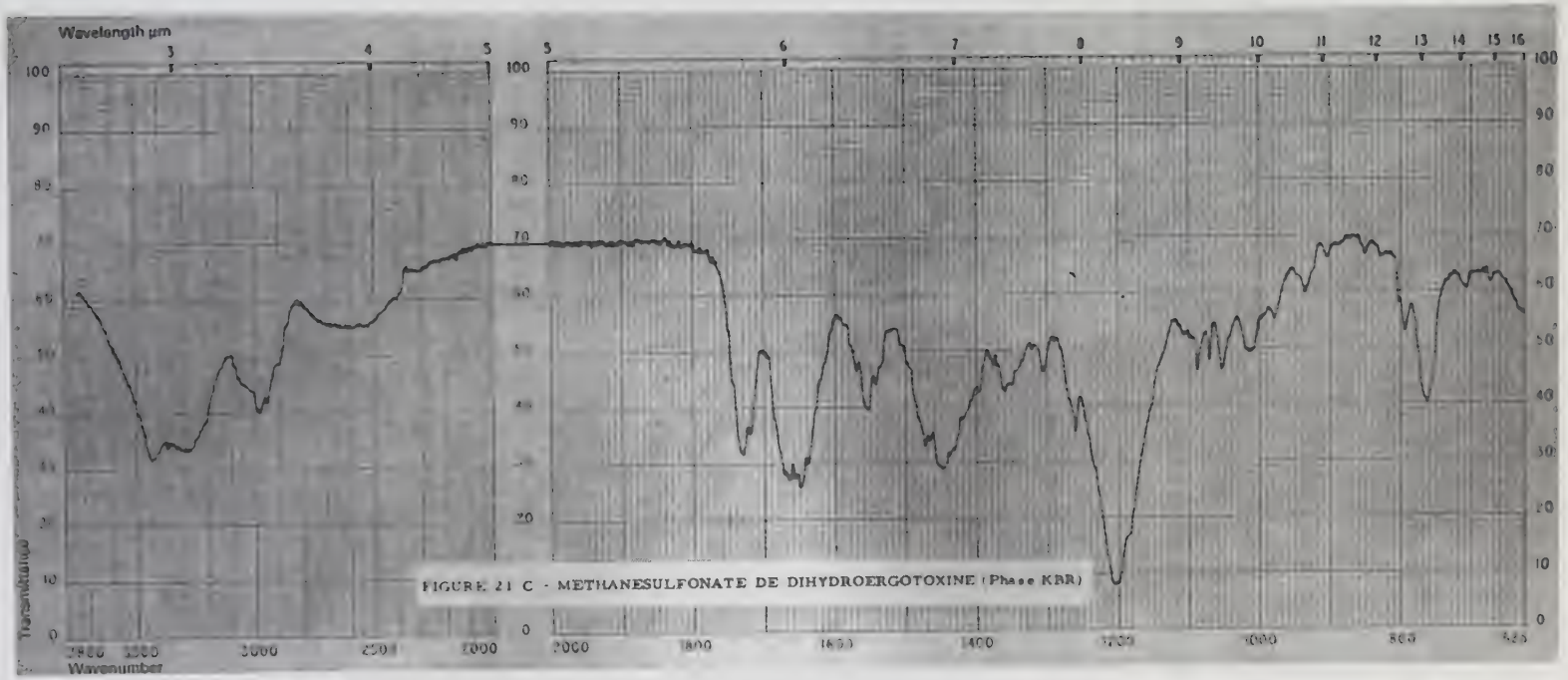


FIGURE 21 C - METHANESULFONATE DE DIHYDROERGOTOXINE (Phase KBR)

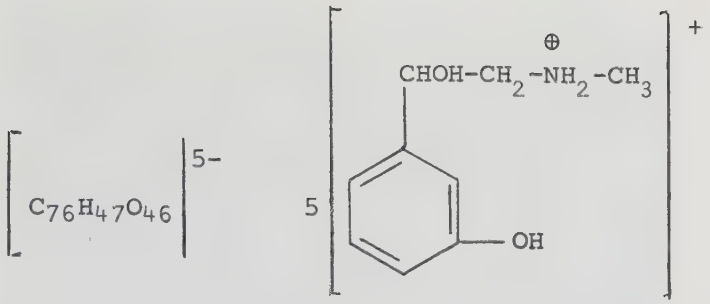
X. TANNATES DE BASES ORGANIQUES.

Nous avons caractérisé trois tannates :

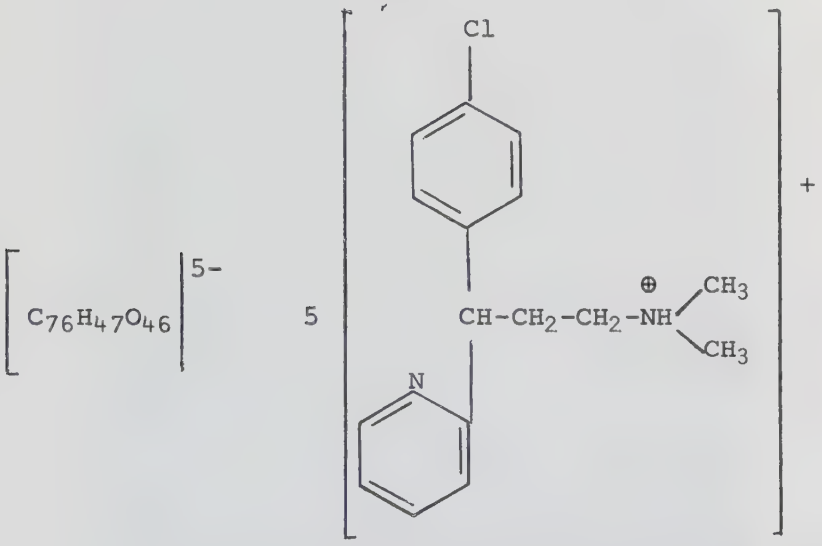
. le tannate de phényléphrine (formule A)
. le tannate de chlorprophenpyridamine (formule B)
. le tannate de pyrilamine (formule C).

Ils sont insolubles dans tous les solvants, eau et solvants organiques. Il est, certes, possible de mettre en évidence l'acide tannique et la base, mais l'existence du sel n'est pas pour autant démontrée. L'absorption dans l'infra-rouge différencie indiscutablement la base et le tannate (figure 22 A, 22 B, 22 C, 22 D, 22 E, 22 F).

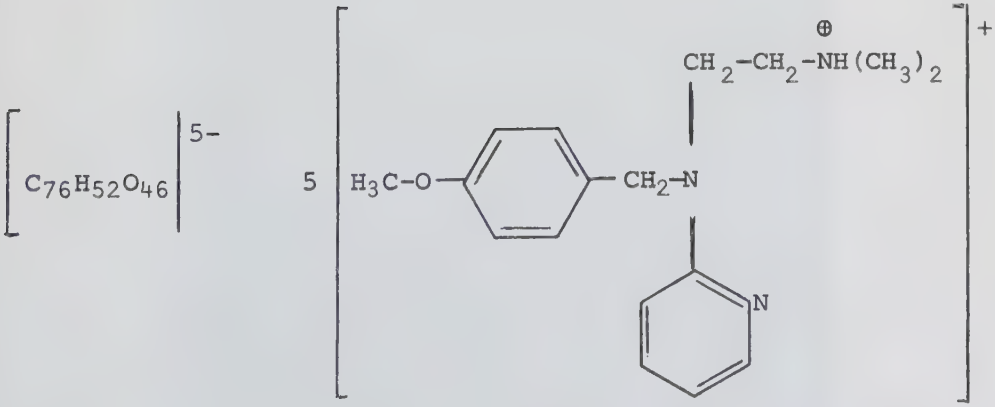
Les spectres sont déterminés à partir d'une suspension dans le Nujol, ou en phase liquide, sur les figures 22 A, 22 B, 22 D, EE F, les bandes du Nujol sont caractérisées par le signe (x).



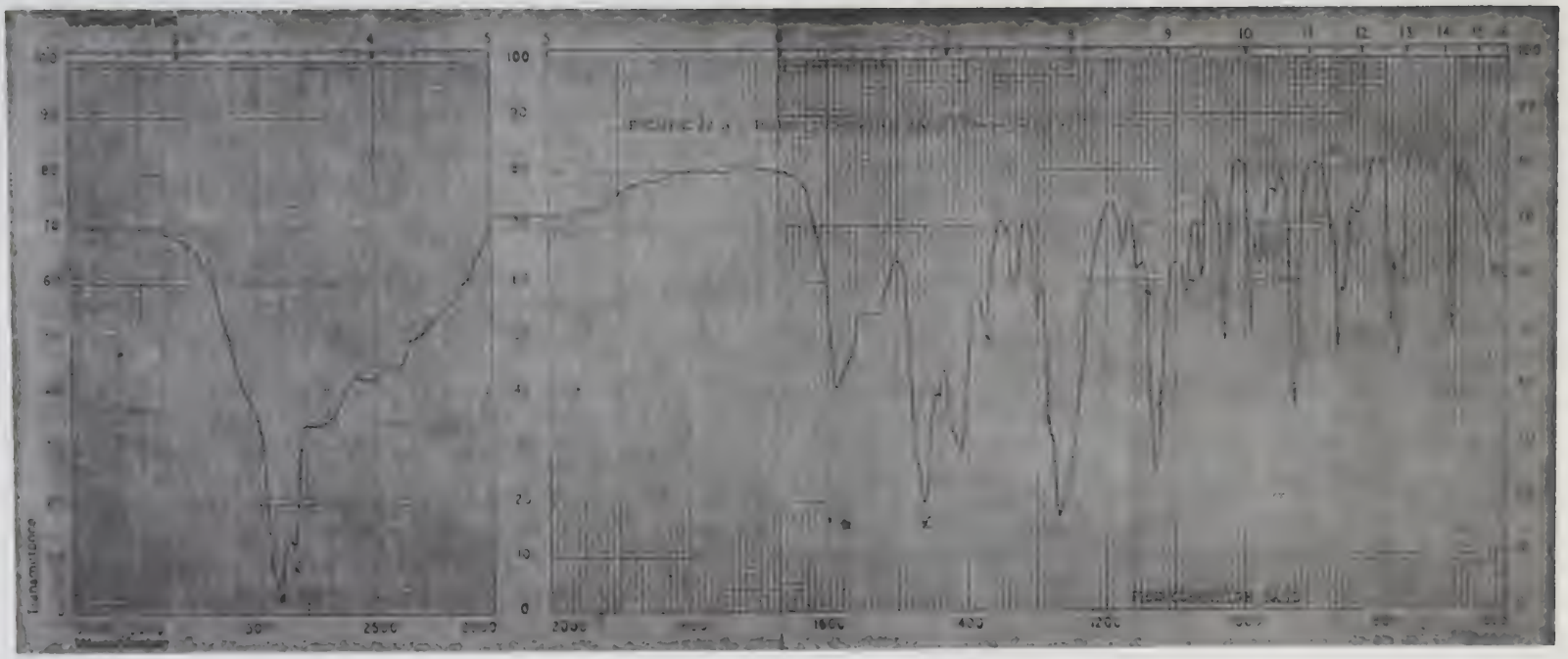
Tannate de Phénylephrine (formule A)

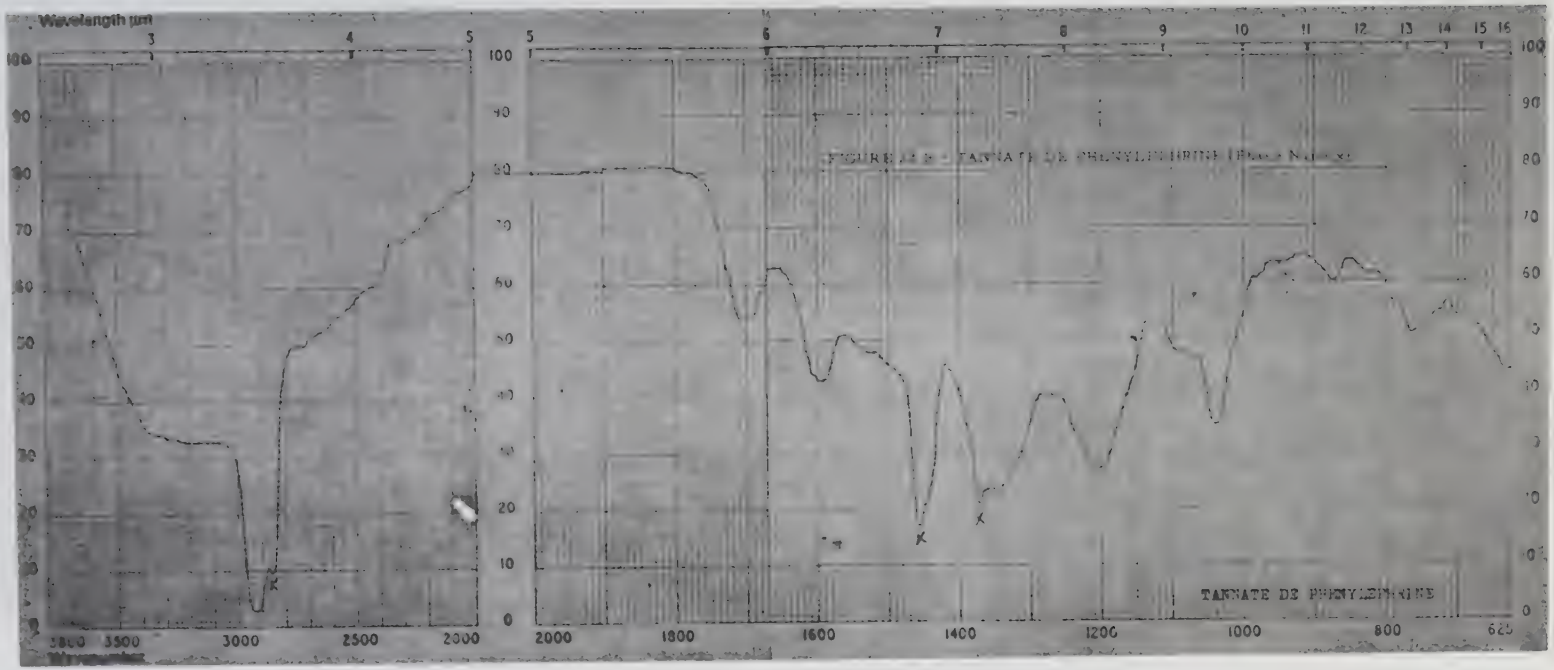


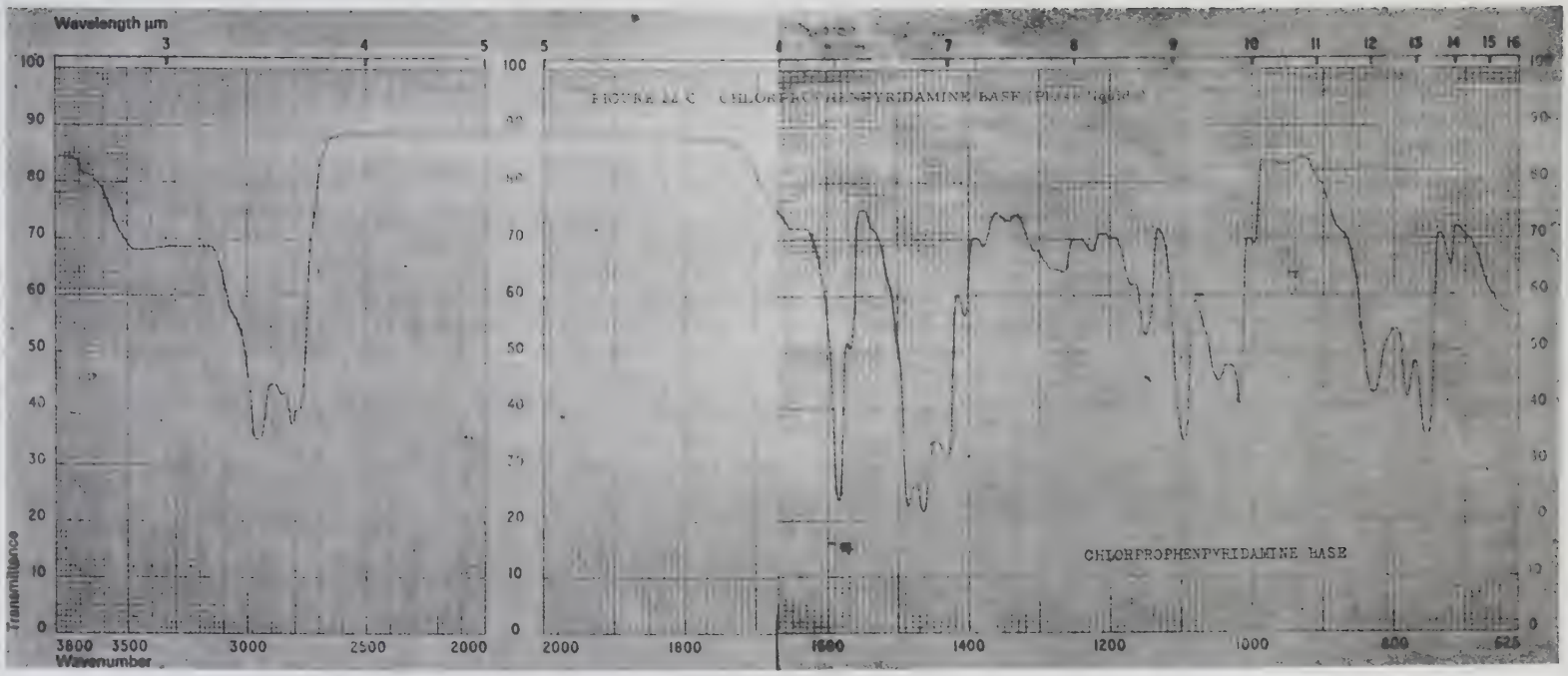
Tannate de Chlorprophenpyridamine (formule B)



Tannate de Pyrilamine (formule C)




Wavelength µm
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
3800
3500
3000
2500
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
TANNATE DE PHENYLEPHRINE


Wavelength μm
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Transmittance
3800
3500
3000
2500
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
625
Wavenumber
CHLORPROPHENPYRIDAMINE BASE

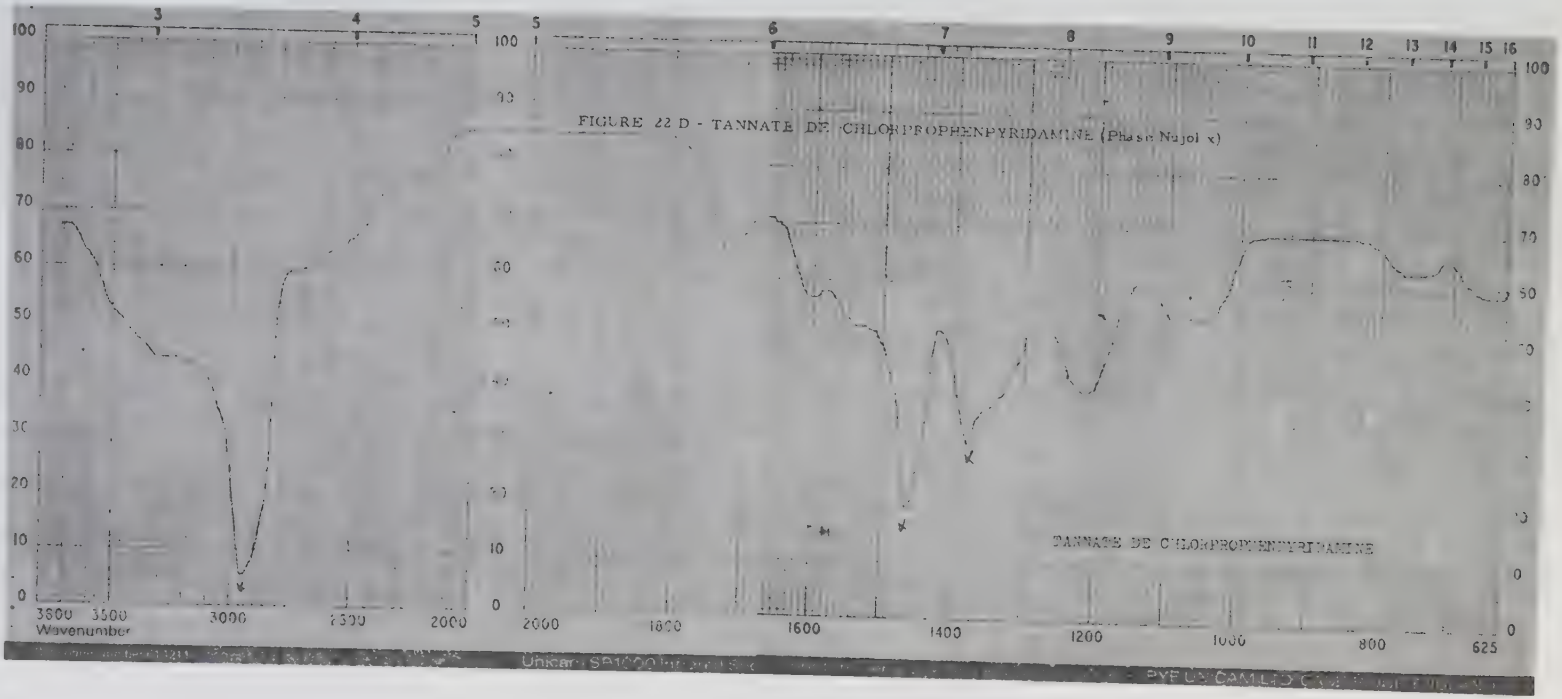


FIGURE 22 D - TANNATE DE CHLORPROPHENPYRIDAMINE (Phase Nujol x)

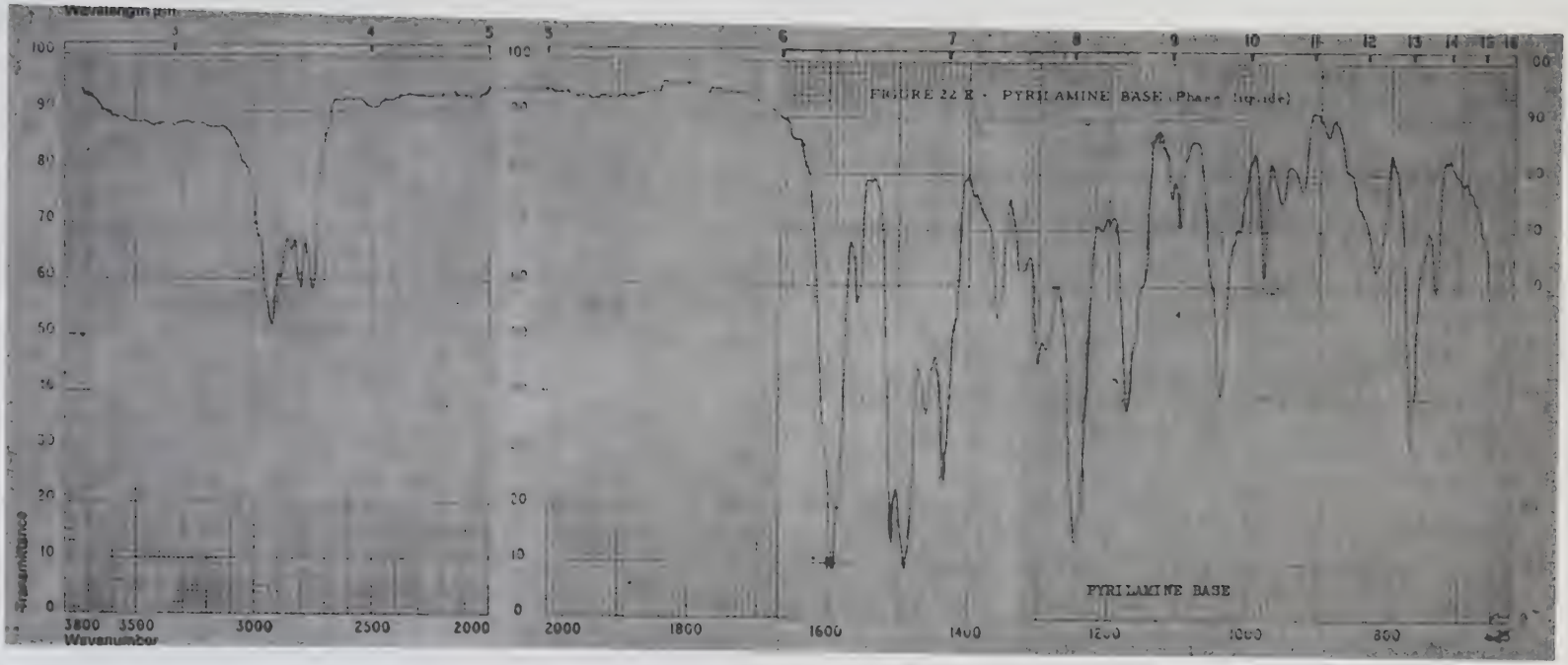


FIGURE 22 E - PYRILAMINE BASE (Phase Separated)

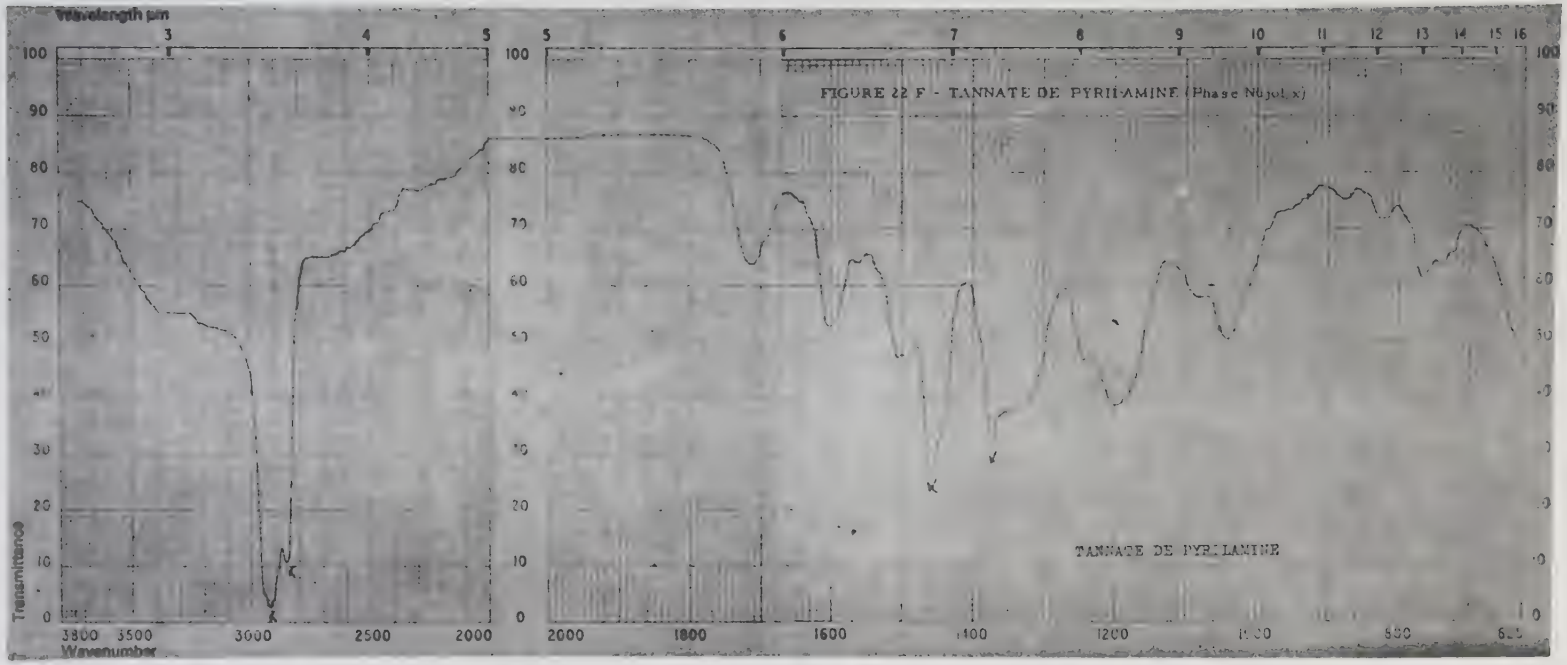


FIGURE 22 F - TANNATE DE PYRILAMINE (Phase Nujol x)

C H A P I T R E I V

ANTIBIOTIQUES

Les méthodes utilisées pour le dosage et l'identification des antibiotiques sont de trois ordres :

1°. Les méthodes chimiques basées sur la structure et les fonctions de la molécule

2°. Une méthode physique, la spectrophotométrie dans l'ultra-violet

3°. Les méthodes microbiologiques : on détermine la quantité de l'antibiotique à essayer et la quantité de l'étalon international provoquant le même degré d'inhibition d'une culture d'un microorganisme convenablement choisi.

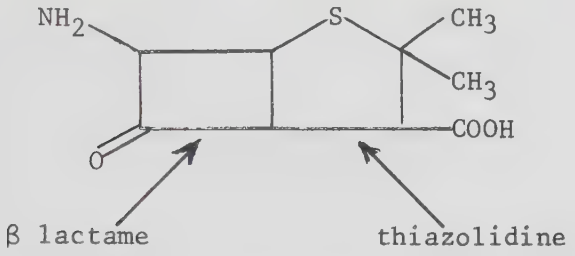
Nous proposons une méthode basée sur le spectre d'absorption dans l'infra-rouge qui présente les avantages suivants :

1°. en opérant à une longueur d'onde bien déterminée, on dose les antibiotiques (dosage chimique ou physique)

2°. le spectre total de l'antibiotique entre 625 cm^{-1} et 3 800 cm^{-1} constitue un critère de pureté; toute altération entraînant une diminution de l'activité sera décelée par la modification du spectre. L'utilisation de la spectrophotométrie I.R. est capable de remplacer la méthode microbiologique.

I. PENICILLINES.

Les pénicillines sont obtenues par synthèse à à partir de l'acide amino - 6 pénicillamique (formule D), dans le but d'obtenir des produits à plus large spectre, ou destinés à la voie buccale.



Acide amino - 6 pénicillamique
Formule D

La spectrophotométrie I. R. constitue une méthode de choix pour leur identification ou pour leur différenciation. Elle a été d'ailleurs adoptée par la pharmacopée britanique.

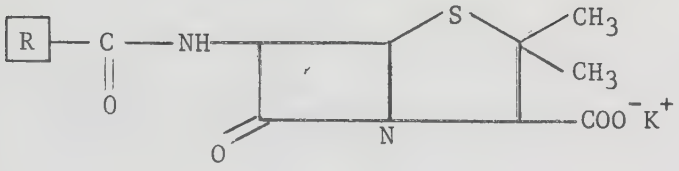
On peut classer les pénicillines en trois groupes :

1°. les pénicillines résistantes aux pénicilinases : Méthicilline, oxacilline, cloxacilline

2°. les pénicillines à large spectre : ampicilline, carbénicilline

3°. les pénicillines acido-résistantes au suc gastrique : phénoxyméthyl pénicilline, phénéthicilline, clométocilline.

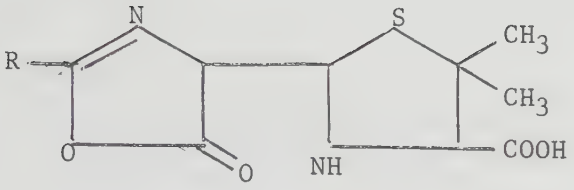
Elles se distinguent chimiquement par le substituant R de la chaîne latérale amidée (formule E).



Pénicilline
Formule E

Le tracé du spectre I. R. (18) en pastille de KBr entre 4 000 cm^{-1} et 700 cm^{-1}, permet de reconnaître chacune d'elles, soit sous forme de sel (bande de Coo^-) soit sous forme d'acide (bande de CooH). Les principales différences spectrales s'observent dans la zone située entre 1 000 cm^{-1} à 1 250 cm^{-1}. Toutes les pénicillines semi-synthétiques sous forme acide présentent entre 1 800 et 1 650 cm^{-1} trois bandes intenses attribuables aux différentes fonctions carbonylées. La première, a 1 790 cm^{-1}, est la plus intense et peut être attribuée à la fonction β lactame, liée au cycle thiazolidine.

La position anormalement élevée en fréquence de cette bande du carbonyle amidique, s'explique par un effet de tension cyclique et permet d'exclure pour la pénicilline une formule de type oxazolone (formule F).



Formule F - structure oxazolone

La deuxième bande, assez large à 1 740 cm^{-1}, correspond au mode de vibration de l'acide carboxylique; elle disparaît dans les sels.

La troisième, située à 1 695 cm^{-1} est liée à la chaîne latérale.

On a choisi la bande β lactame pour les déterminations quantitatives, l'activité pharmaceutiques étant liée à l'intégrité de cette fonction.

Il est bien connu en effet que la plupart des solutions aqueuses de pénicilline s'altèrent au cours du temps et que le premier stade se manifeste par l'attaque du noyau β lactame particulièrement fragile, la rupture se faisant entre le carbonyle et l'azote; on assiste donc à une régression de la bande dans la région de 1 790 cm^{-1}, qui augmente au fur et à mesure que l'altération se poursuit.

Ainsi, on peut contrôler la pénicilline par spectrophotométrie I. R. dans les différentes formes pharmaceutiques spécialisées.

BOWLING, BARNES et coll. (10) identifient et dosent par spectrophotométrie I. R. les différentes formes de cristaux de sels sodiques des pénicillines G, F, X, K dans le Nujol grâce à leurs pics d'absorption caractéristiques. Cette technique a les avantages suivants :

- détection de la présence de types variés de sels sodiques de pénicillines

- précision supérieure à celle des autres méthodes analytiques
- réalisation rapide.

COY N. H. et coll. (20) ont dosé le sel de procaïne de la benzylpénicilline dans le chloroforme.

II. THIOLUTINE ET AUREOTHRICINE (60).

Le mélange thiolutine - auréothricine a été dosé par spectrophotométrie I. R. après pastillage avec KBr respectivement à 973 cm^{-1} où l'auréothricine n'absorbe pas et à 943 cm^{-1} où la thiolutine n'absorbe pas.

III. PRIMYCINE (67).

La caractérisation optique de la primycine en U.V. peut être complétée par son spectre I. R., déterminé en suspension dans le Nujol.

IV. CHLORAMPHENICOL (33).

La spectrophotométrie I. R. permet l'identification et le dosage du chloramphénicol et, d'autre part, la différenciation entre les formes α et β.

V. ERYTHROMYCINE ET PROPIONYLERYTHROMYCINE.

WASHBURN et coll. (78) ont réalisé le dosage de l'érythromycine pour des concentrations comprises entre 20 et 30 mg/ml. Cette méthode nécessite donc une concentration élevée et donne une faible densité optique.

C'est pourquoi nous proposons le mode opératoire suivant, également valable pour la propionylérythromycine.

1°. Principe.

Le dosage est effectué à 1 720 cm^{-1} dans le chloroforme à des concentrations comprises entre 4 mg/ml et 20 mg/ml pour l'érythromycine, et à 1 750 cm^{-1} entre 2,5 mg/ml et 10 mg/ml pour la propionylérythromycine. L'identification est réalisée en phase solide (pastillage avec KBr).

L'intérêt de notre technique par rapport à celle de WASHBURN est le suivant :

- nous présentons le spectre complet de produit entre 625 cm^{-1} à 3 800 cm^{-1}, il permet de déceler une altération éventuelle
- le dosage se fait à 1 720 cm^{-1} et 1 750 cm^{-1}; il nécessite des concentrations moins élevées et il est beaucoup plus précis
- d'autre part les spectres de l'érythromycine et de la propionylérythromycine sont différents dans la région de 625 cm^{-1} à 1 800 cm^{-1}, ce qui rend possible l'identification de chacun des deux composés (figure 23 A, 23 B).

2°. *Technique.*

1 g d'érythromycine est dissous dans 50 ml de chloroforme (solution à 20 mg/ml).

On prépare une gamme entre 4 à 20 mg/ml.

On introduit chaque dilution dans la cellule à NaCl sous une épaisseur de 0,4 mm; on mesure la hauteur de pic par rapport au chloroforme à 1 720 cm^{-1} (figure 24). Dans le cas de la propionylérythromycine, on procède de la même façon à 1 750 cm^{-1}, la gamme est comprise entre 2,5 et 10 mg/ml (figure 24 A).

Pour l'identification 1 mg de substance est mélangé à 100 mg de KBr; les spectres sont représentés par les figures 23 A, 23 B.

3°. *Applications aux médicaments.*

A. DOSAGE.

Un nombre de comprimés correspondant à 250 mg d'érythromycine ou à 100 mg de propionylérythromycine est pulvérisé au mortier, puis traité par 2 fois 10 ml de chloroforme; la solution est filtrée, ramenée à 25 ml; on obtient une solution à 10 mg/ml d'érythromycine ou 4 mg/ml de propionylérythromycine.

Chaque solution est traitée de la même façon que la gamme; la lecture est effectuée à 1 720 cm^{-1} pour l'érythromycine et à 1 750 cm^{-1} pour la propionylérythromycine.

B. IDENTIFICATION.

Quelques ml de solution chloroformique sont chauffés au bain-marie jusqu'à siccité. 1 mg de résidu est repris par 100 mg de KBr; on procède selon la méthode habituelle.

Le tableau IX rend compte de nos résultats.

Tableau IX

Nom des spécialités pharmaceutiques	*Formes pharmac.*	*Composants*	*Erythromycine Propionylérythromycine*	
			théorique	*trouvé*
rythromycine ®	Comprimés	Erythromycine	200mg/comp.	199mg/comp.
ubitracine ®	-	. propionylérythromycine . chlorhydrate de tétracycline . chlorhydrate de lysosyme	150mg/comp.	149mg/comp.

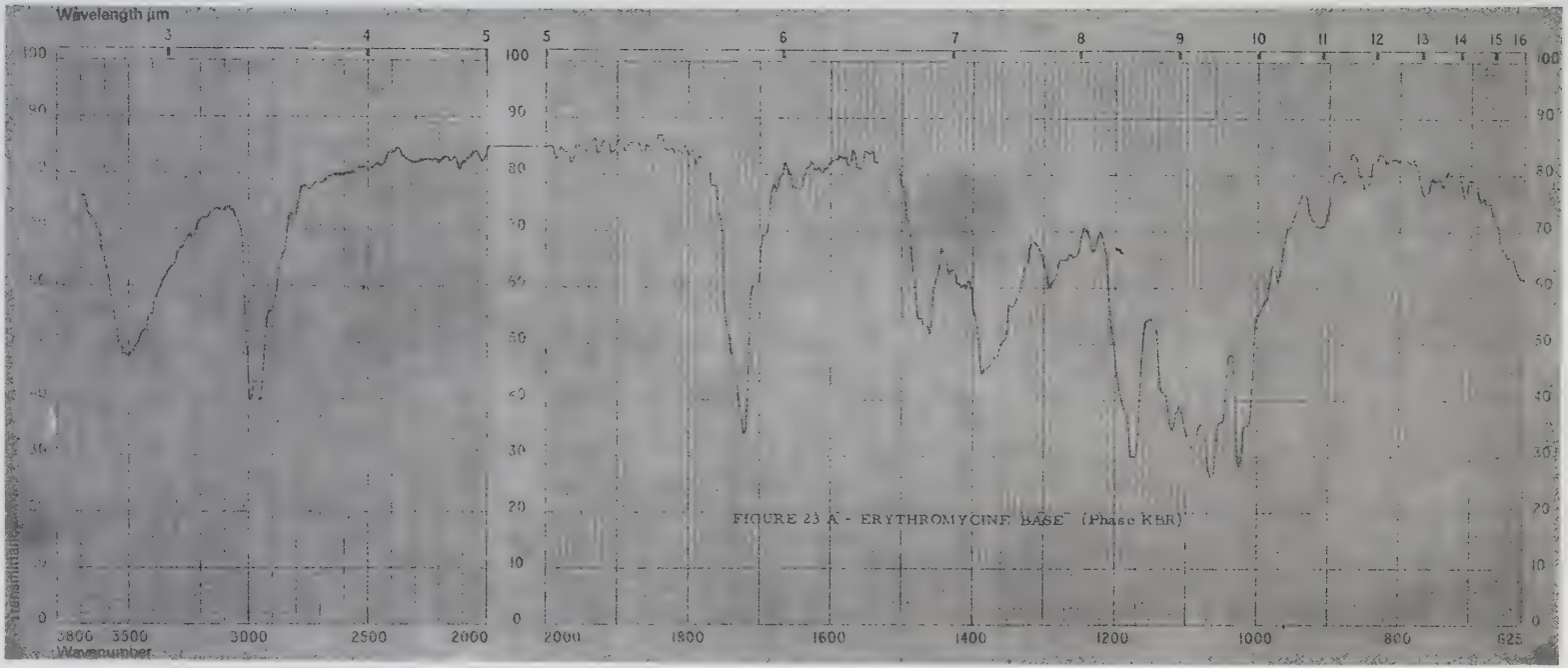


FIGURE 23 A - ERYTHROMYCINE BASE (Phase KBR)

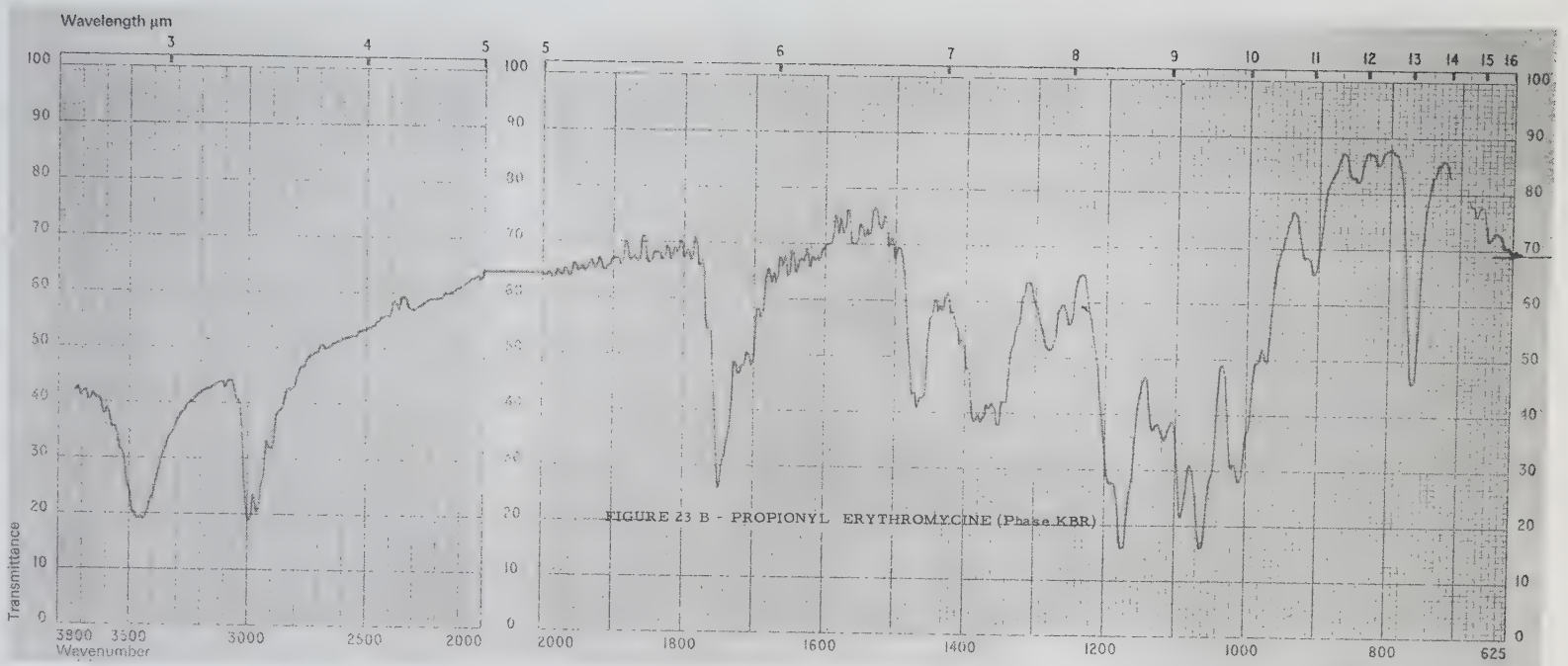
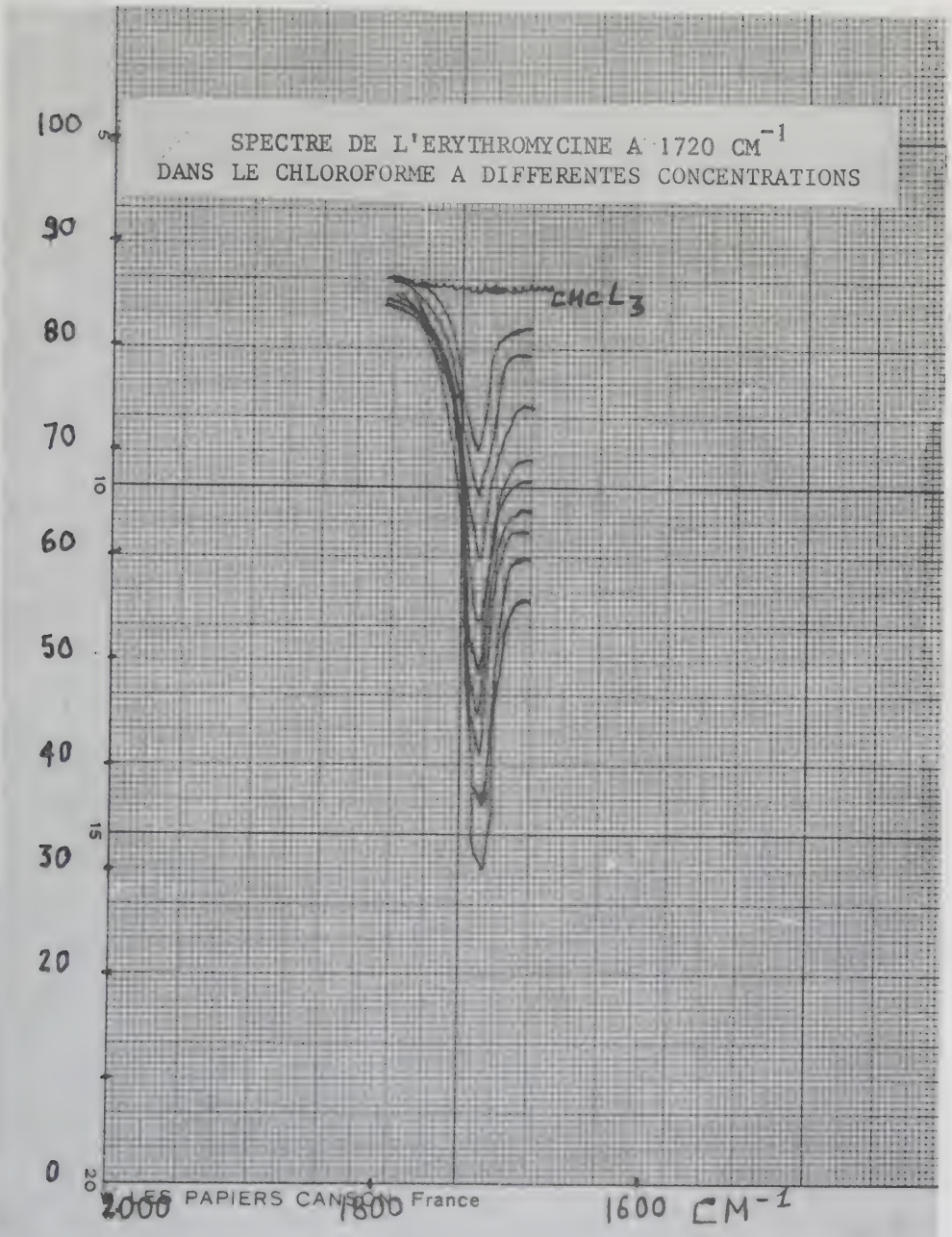
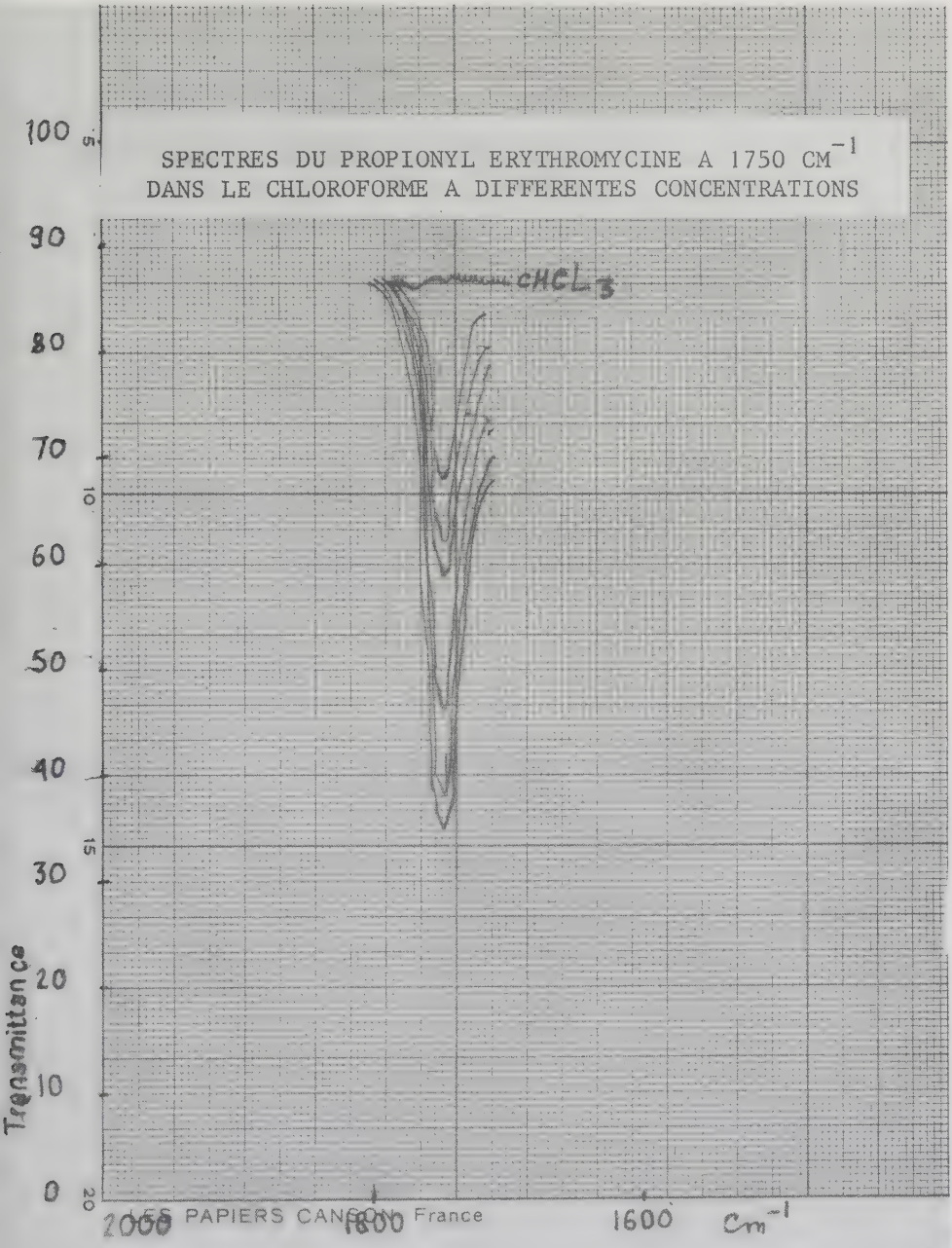


FIGURE 23 B - PROPIONYL ERYTHROMYCINE (Phase KBR)



concentrations (mg)	20	16,6	14,2	12,5	11,1	8,3	6,6	5	4
D.O.	0,45	0,375	0,32	0,28	0,25	0,2	0,16	0,11	0,09

FIGURE 24



concentrations (mg)	10	8,3	6,6	5	4	2,5
D.O.	0,39	0,33	0,26	0,2	0,16	0,1

FIGURE 24 A

VI. SPIRAMYCINE (ROVAMYCINE).

La spiramycine a été extraite de cultures de Streptomyces ambofaciens par PINNERT-SINDICO en 1955.

1°. Principe.

Nous avons dosé par spectrophotométrie I. R. en solution chloroformique à des concentrations comprises entre 3 mg/ml et 12 mg/ml à 1 740 cm^{-1} sous une épaisseur de 0,4 mm, l'identification est réalisée après pastillage avec KBr (figure 25).

2°. Technique.

300 mg de substance sont traités par 25 ml de chloroforme; on obtient une solution contenant 12 mg/ml de spiramycine, à partir de laquelle on prépare une gamme de concentration comprise entre 3 mg/ml et 12 mg/ml. La loi de Beer-Lambert est vérifiée dans ces conditions à 1 740 cm^{-1}. Chaque dilution est introduite dans la cellule à NaCl; on mesure la hauteur du pic à 1 740 cm^{-1} à partir de la ligne de base du chloroforme (figure 26).

3°. Applications aux formes pharmaceutiques.

A. DOSAGE.

Nous avons appliqué cette méthode aux comprimés de Rovamycine "500" Spécia®; un comprimé contenant 500 mg de Rovamycine est traité par 2 × 10 ml de chloroforme; on filtre; le volume est ramené à 50 ml (10 mg/ml).

Cette solution est traitée de la même façon que la gamme. Les résultats sont satisfaisants et reproductibles (erreur ± 3 %).

B. IDENTIFICATION.

5 ml de solution chloroformique sont chauffés au bain-marie jusqu'à siccité; le résidu (1 mg) est pastillé avec KBr.

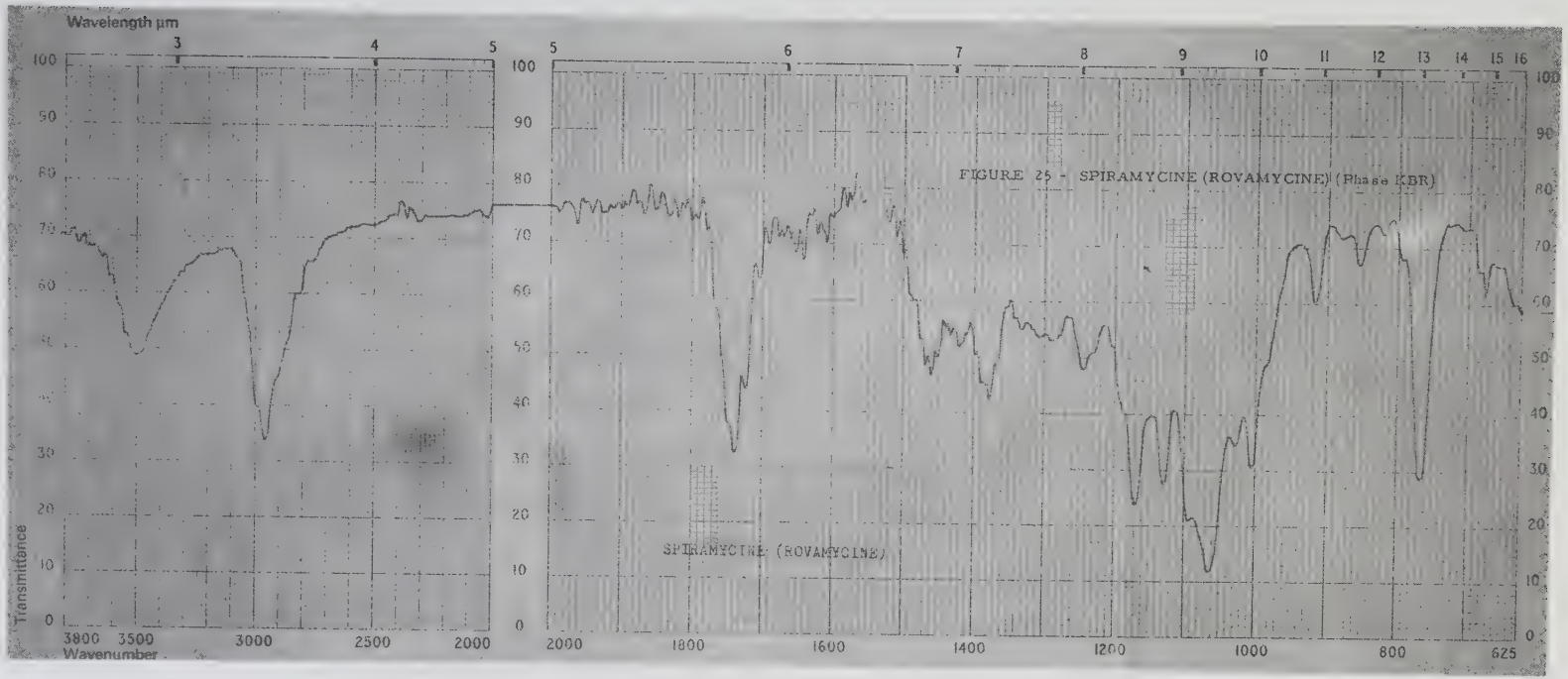
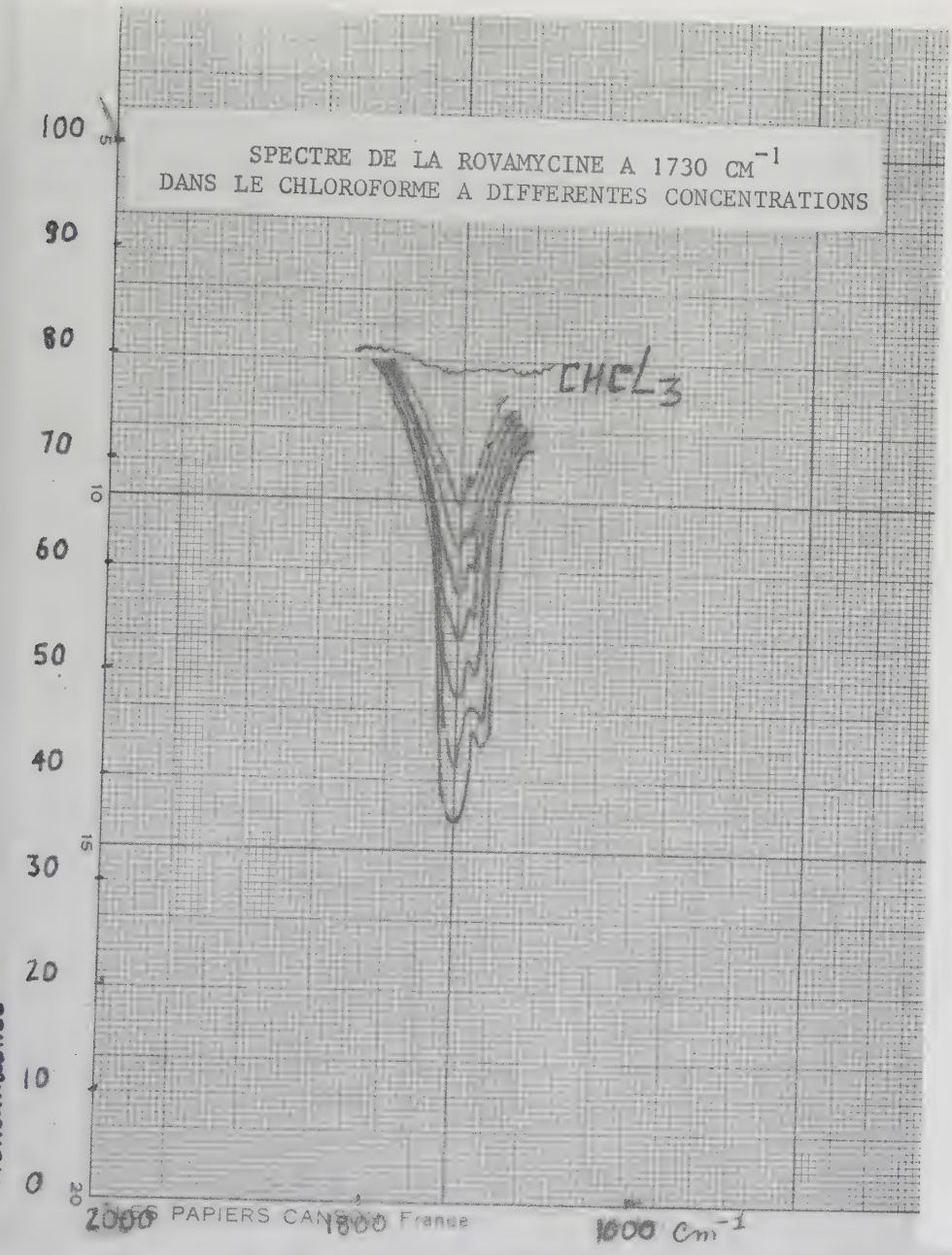


FIGURE 25 - SPIRAMYCINE (ROVAMYCINE) (Phase KBR)



centrations (mg)	12	10	7,5	6	5	3,7	3
D.O.	0,36	0,30	0,23	0,18	0,15	0,11	0,085

FIGURE 26

VII. VIRGINIAMYCINE.

La virginiamycine est un antibiotique original découvert par les laboratoires de recherche R.I.T.

1°. Principe.

Nous avons étudié l'identification et le dosage par spectrophotométrie I. R., dans différents médicaments : dans les uns elle représente le seul principe actif, dans d'autres elle est mélangée avec la tétracycline.

Le dosage se fait dans le chloroforme à 1 730 cm^{-1} pour des concentrations variant entre 2,5 mg/ml et 8 mg/ml; identification fait appel au pastillage avec KBr.

2°. Technique.

A. DOSAGE.

200 mg de virginiamycine sont dissous dans 25 ml du chloroforme; on obtient une solution à 8 mg/ml. On fait une gamme à partir de cette solution entre 2,5 mg/ml et 8 mg/ml. On détermine la hauteur du pic à 1 730 cm^{-1}, contre la ligne de base de chloroforme, sous une épaisseur de 0,5 mm (figure 27).

B. IDENTIFICATION.

1 mg de produit pur est finement pulvérisé et comprimé avec 100 mg de KBr.

On lit entre 625 cm^{-1} et 3 800 cm^{-1} (figure 28).

3°. Applications aux formes pharmaceutiques.

A. DOSAGE.

On prépare à partir d'un nombre de comprimés convenable, une solution chloroformique de concentration située entre 2 mg/ml et 8 mg/ml, on filtre.

On procède comme il a été indiqué.

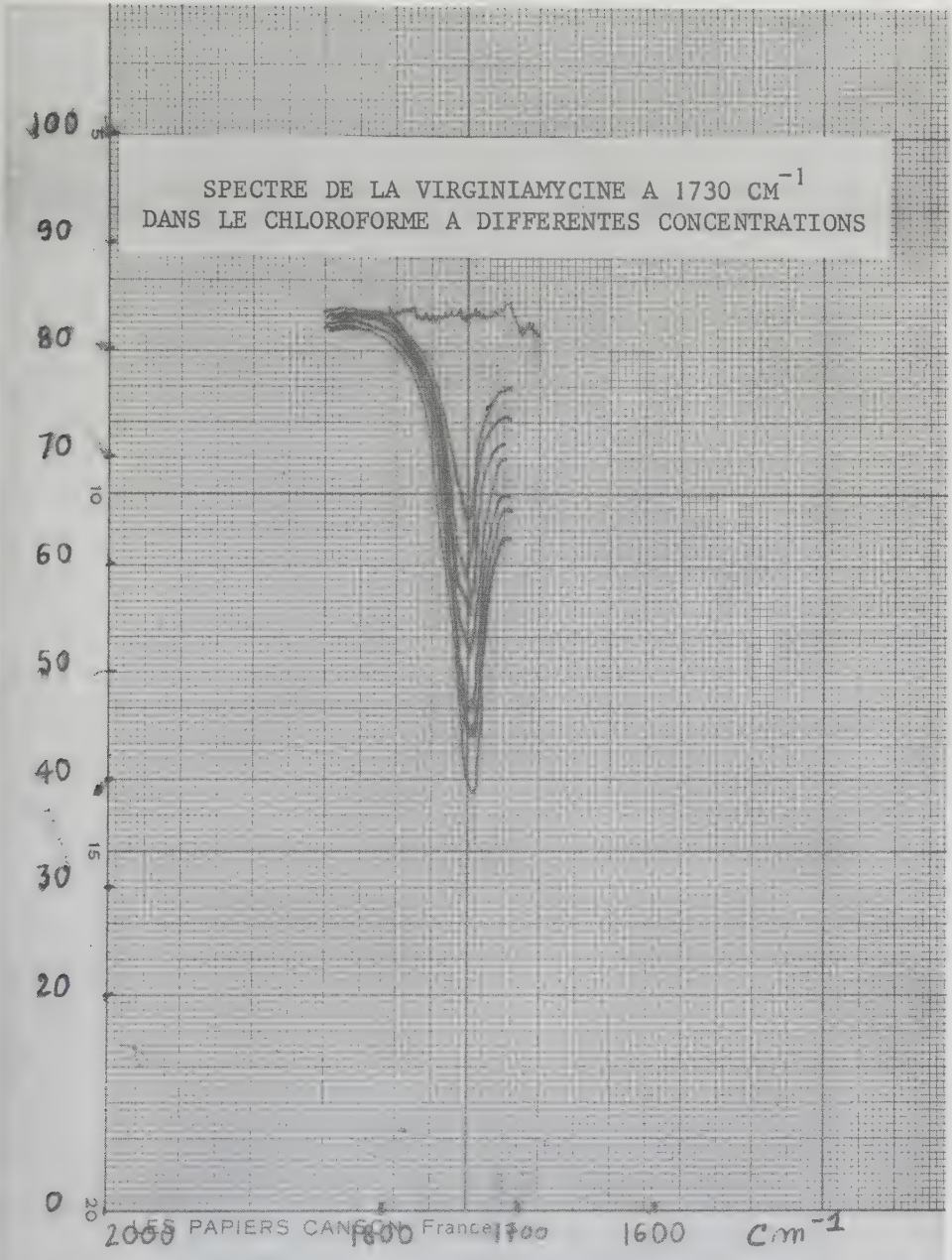
B. IDENTIFICATION.

5 ml de solution chloroformique sont évaporés à sec; 1 mg du résidu est comprimé avec KBr.

Nos résultats sont rapportés tableau X.

TABLEAU X

Nom des spécialités	*Formes pharmac.*	*Composants*	*Virginiamycine*	
			théorique	*trouvé*
Staphylomycine ®	Comprimés	Virginiamycine	250 mg/comp.	240 mg/comp.
		.Virginia-mycine .Tétracycline	250 mg/comp.	241 mg/comp.



concentrations (mg)	8	6,6	5	4	3,3	2,5
D.O.	0,33	0,27	0,2	0,16	0,13	0,1

FIGURE 27

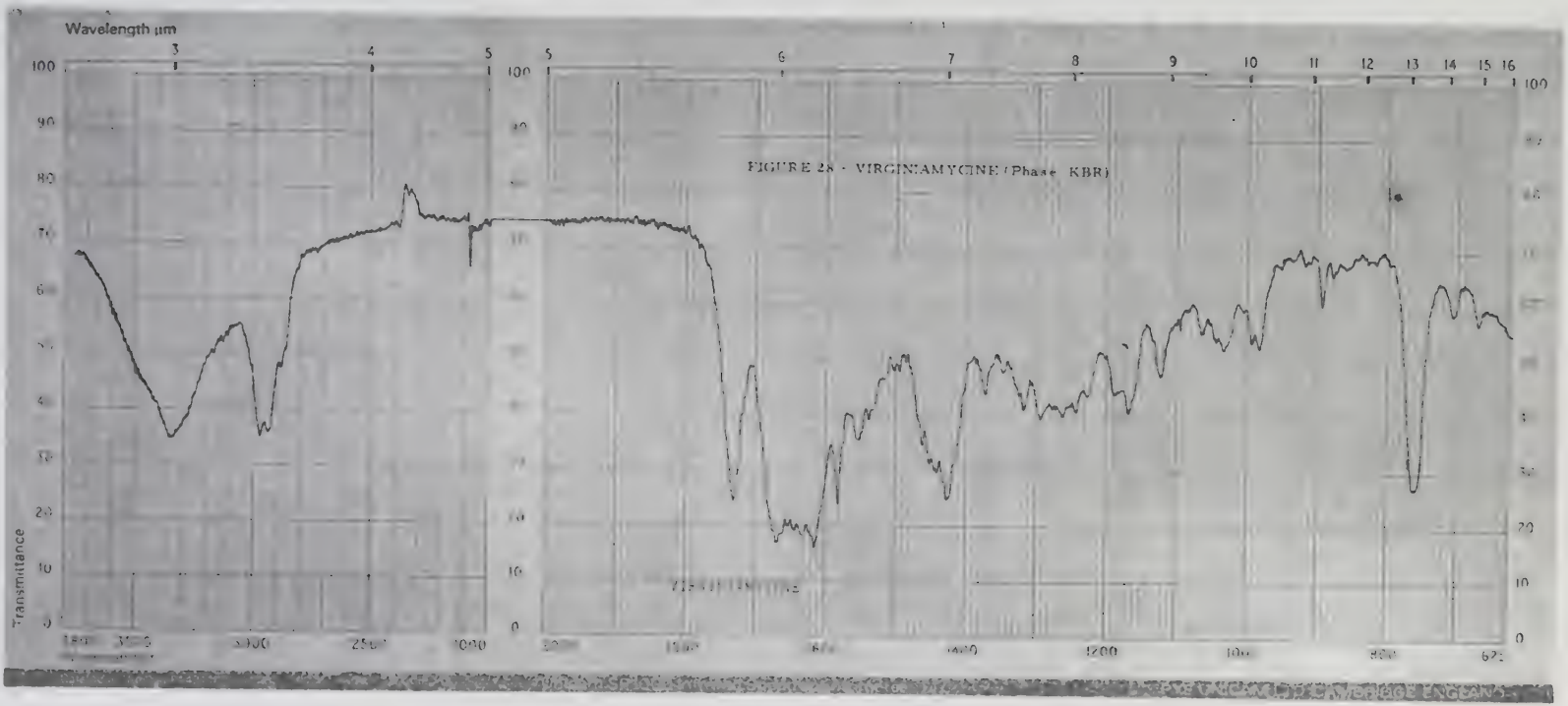
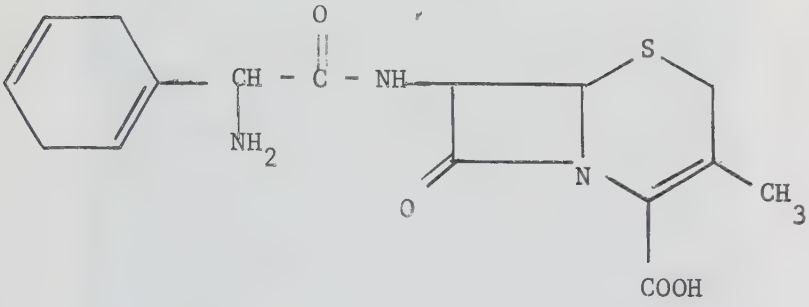


FIGURE 28 - VIRGINIAMYCINE (Phase KBR)

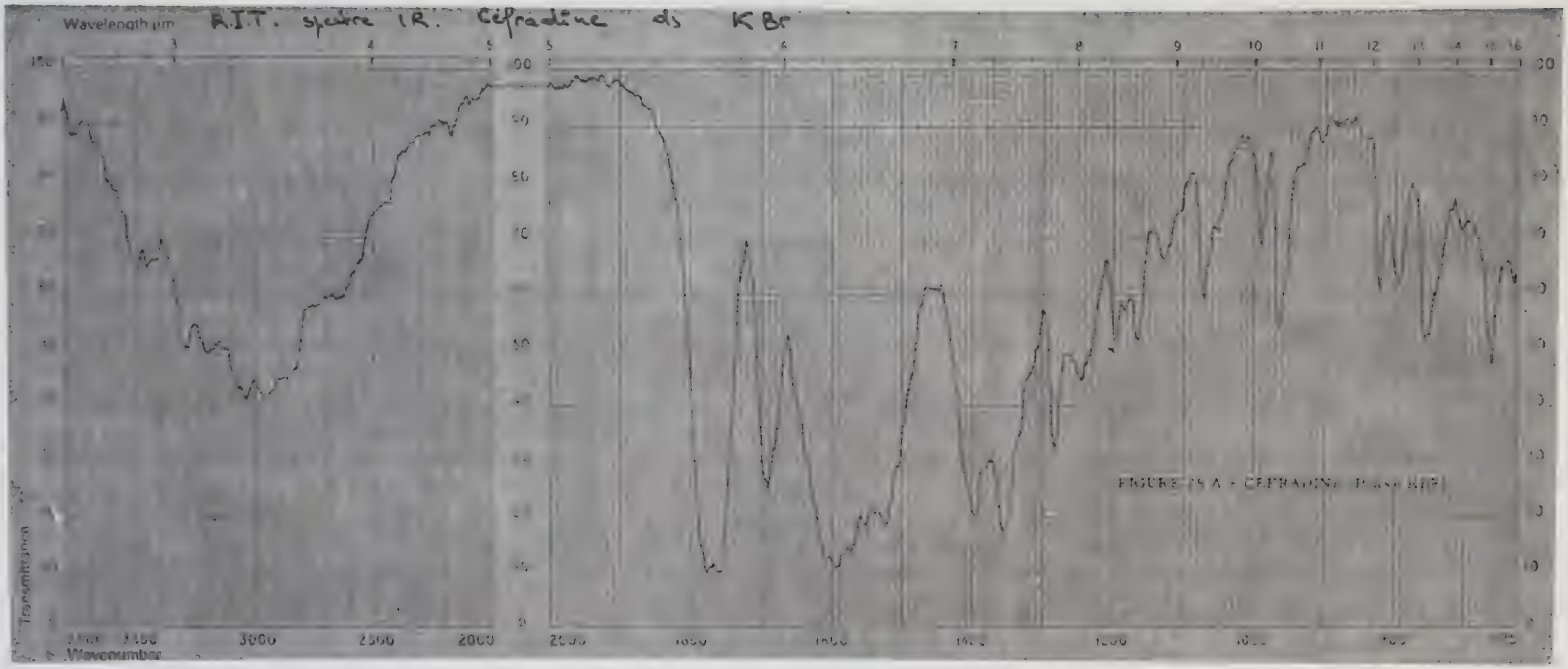
VIII. CEFRADINE.

La céfradine est un antibiotique d'origine fungique (formule G).



Céfradine
Formule G

Nous l'avons caractérisé par son spectre I. R. dans des gélules par la méthode au KBr (figure 28 A).


R.I.T. spectre I.R. Cefradine dis KBr
Wavelength µm
Transmittance
Wavenumber

C H A P I T R E V

LES STEROÏDES

La spectrophotométrie I. R. est devenue une technique d'analyse de routine des stéroïdes, sans elle les spectaculaires synthèses de la cortisone et des nouveaux composés analogues, entre 1950 et 1957, n'auraient pas connu un tel développement.

DEBRINER (22) et COLE (19) ont publié une excellente mise au point sur ce sujet.

BAKKER et coll. (6) ont étudié la configuration naturelle et la configuration rétro à l'aide de l'absorption I.R.

DOBRINERE et JONES (23) ont publié un atlas des spectres I.R. de plus de 300 stéroïdes.

JONES et HERLING (36) ont étudié pour 130 stéroïdes, l'absorption caractéristique du carbonyl, dont l'intensité et la fréquence sont souvent affectées par la nature du groupement fonctionnel adjacent (6,51).

I. HYDROEPIANDROSTERONE, TESTOSTERONE ET 17 β OESTRADIOL.

Le dosage de ces stéroïdes a été réalisé en phase solide (KBr) dans des comprimés par ROZANKRANTZ (62) (qui a également envisagé le mélange de deux stéroïdes,par exemple Cortisol et Cortisone,β oestradiol et Oestriol).

II. OESTRONE, EQUILINE, EQUILENINE.

La spectrophotométrie I. R. évite la séparation préalable imposée par les nombreuses méthodes décrites dans la littérature.

FRUCHGOTT et coll. (26 A) ont mesuré l'absorption de chacun des trois composés.

Comme ils sont tous insolubles dans le sulfure de carbone, ils les ont transformés en esters benzène sulforiques, qui, eux, sont solubles dans le solvant. A chaque longueur d'onde fixée pour un ester donné, les deux autres absorbent aussi.

Les auteurs ont recours à un calcul graphique approximatif de la concentration de chacun des trois stéroïdes.

FREDERICK et coll. (25) ont repris ces travaux un an plus tard et ont proposé une méthode plus rapide, mettant en jeu une équation à trois inconnues.

JONAS, CAROL et coll. (35) ont dosé les dérivés d'hydrogène des trois composés.

III. PREGNOLONE.

La spectrophotométrie I. R. a été préconisée pour le dosage de la prégnolone en solution dans le sulfure de carbone (52).

Rappelons que les méthodes chimiques sont basées sur sa précipitation à l'état de dinitro - 2,4 - phénylhydrazone. Elles ne sont utilisables que pour la prégnolone pure, en l'absence de dérivés cétoniques qui seraient, eux aussi, précipités.

IV. STEROLS DU SOJA (34).

Les stérols du soja sont des mélanges de sitostérol et stigmastérol. Seul le dérivé possèdant un groupement CH = CH et donne donc, seul, le spectre correspondant sur lequel peut être basé le dosage.

V. CORTICOSTEROÏDES.

PARSON et coll. (56) ont identifié et dosé les corticostéroïdes et les impuretés susceptibles de les accompagner par spectrophotométrie I. R.

MINKA et coll. (47) ont dosé l'hydrocortisone et son acétate.

ALMA et coll. (2) ont identifié les corticostéroïdes en mélange avec des barbiturates et des sulfamides, après séparation par chromatographie sur papier.

Nous avons nous-même réalisé l'identification et le dosage de l'hydrocortisone et de son acétate dans les préparations pharmaceutiques.

1°. Principe.

Nous partons de solutions dans le bromoforme où les solubilités sont les suivantes :

hydrocortisone : 4 mg/ml à 50°
Acétate d'hydrocortisone : 7 mg/ml à 50°

Les deux composés sont caractérisés par leur spectre d'absorption entre 1 600 cm^{-1} et 1 800 cm^{-1} en solution bromoformique. En effet l'hydrocortisone présente un pic à 1 740 cm^{-1}, l'acétate, deux pics à 1 670 cm^{-1} et à 1 740 cm^{-1} (figure 29 A, 29 B).

La loi de Beer-Lambert est vérifiée :

- pour la Cortisone, entre 0,6 mg/ml et 3 mg/ml à 1 670 cm^{-1} sous une épaisseur de 0,6 mm
- pour l'acétate, entre 2 mg/ml et 6 mg/ml, à 1 740 cm^{-1} sous une épaisseur de 1,5 mm.

2°. Technique.

75 mg d'hydrocortisone ou 150 mg d'acétate sont dissous dans 25 ml de bromoforme, au bain-marie à 50°. On obtient ainsi une solution d'hydrocortisone à 3 mg/ml et une solution de son acétate à 6 mg/ml. On prépare avec chacune d'elles une gamme de 3 mg/ml à 0,6 mg/ml pour l'hydrocortisone et une gamme de 6 mg/ml à 2 mg/ml pour l'acétate.

On introduit chaque dilution successivement dans la cellule à infra-rouge, sous une épaisseur de 1,5 mm pour l'hydrocortisone, de 0,6 mm pour l'acétate. On lit à :

1 670 cm^{-1} pour l'hydrocortisone
1 740 cm^{-1} pour l'acétate.

La densité optique est calculée par rapport à la ligne de base du bromoforme (figure 29 A, 29 B).

3°. *Applications aux médicaments.*

Nous avons dosé l'hydrocortisone dans des comprimés et l'acétate hydrocortisone dans un collyre. Les comprimés sont pulvérisés et triturés avec du bromoforme; le collyre est additionné de bromoforme non miscible au solvant utilisé.

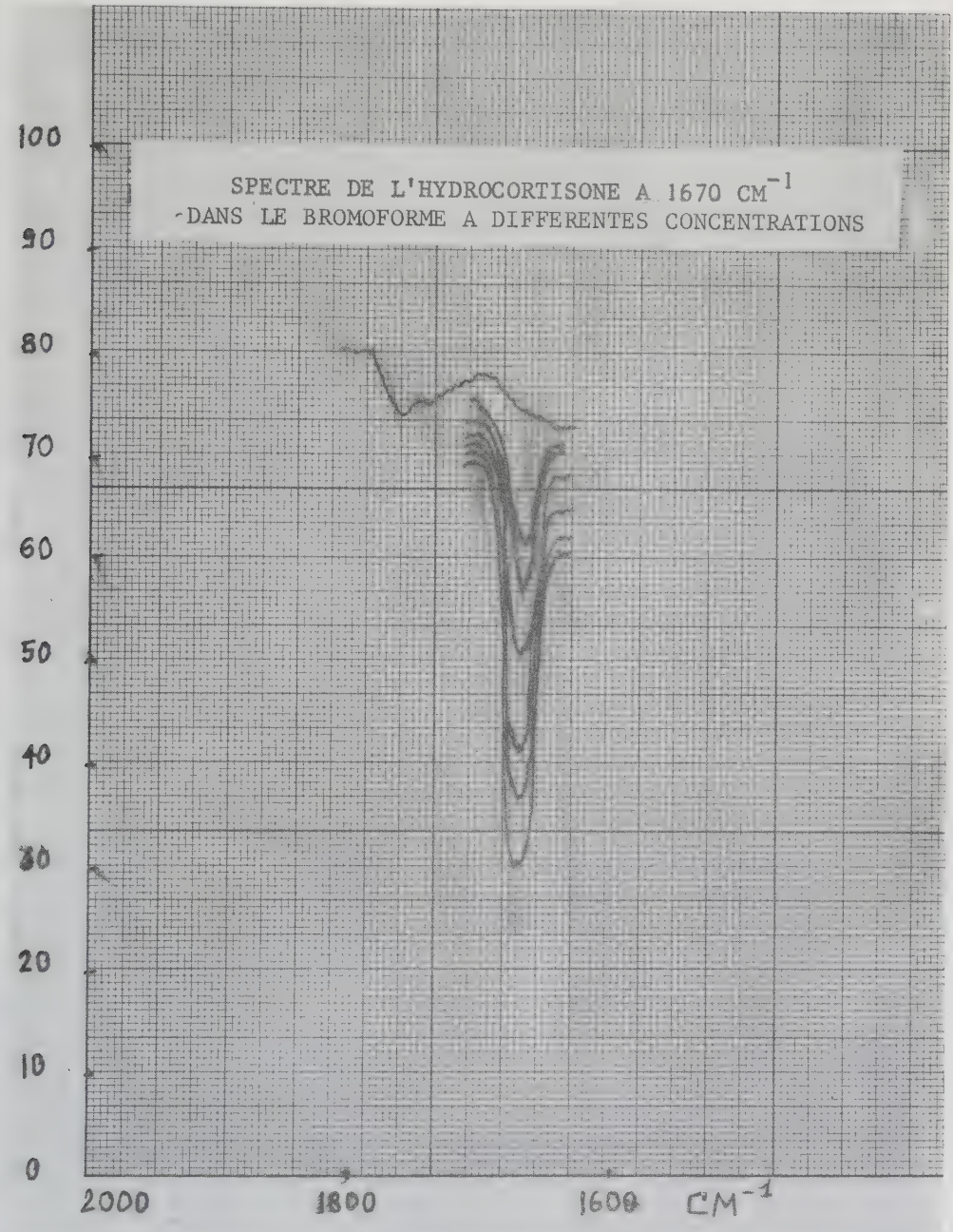
Dans les deux cas le mélange est porté au bain-marie à 50°. Le nombre de comprimés, le volume de collyre et le volume de bromoforme sont calculés en vue d'obtenir une solution d'hydrocortisone à 1 mg/ml et une solution d'acétate d'hydrocortisone à 3 mg/ml.

Les solutions obtenues sont filtrées et examinées en I. R.

Nos résultats sont donnés dans le tableau XI.

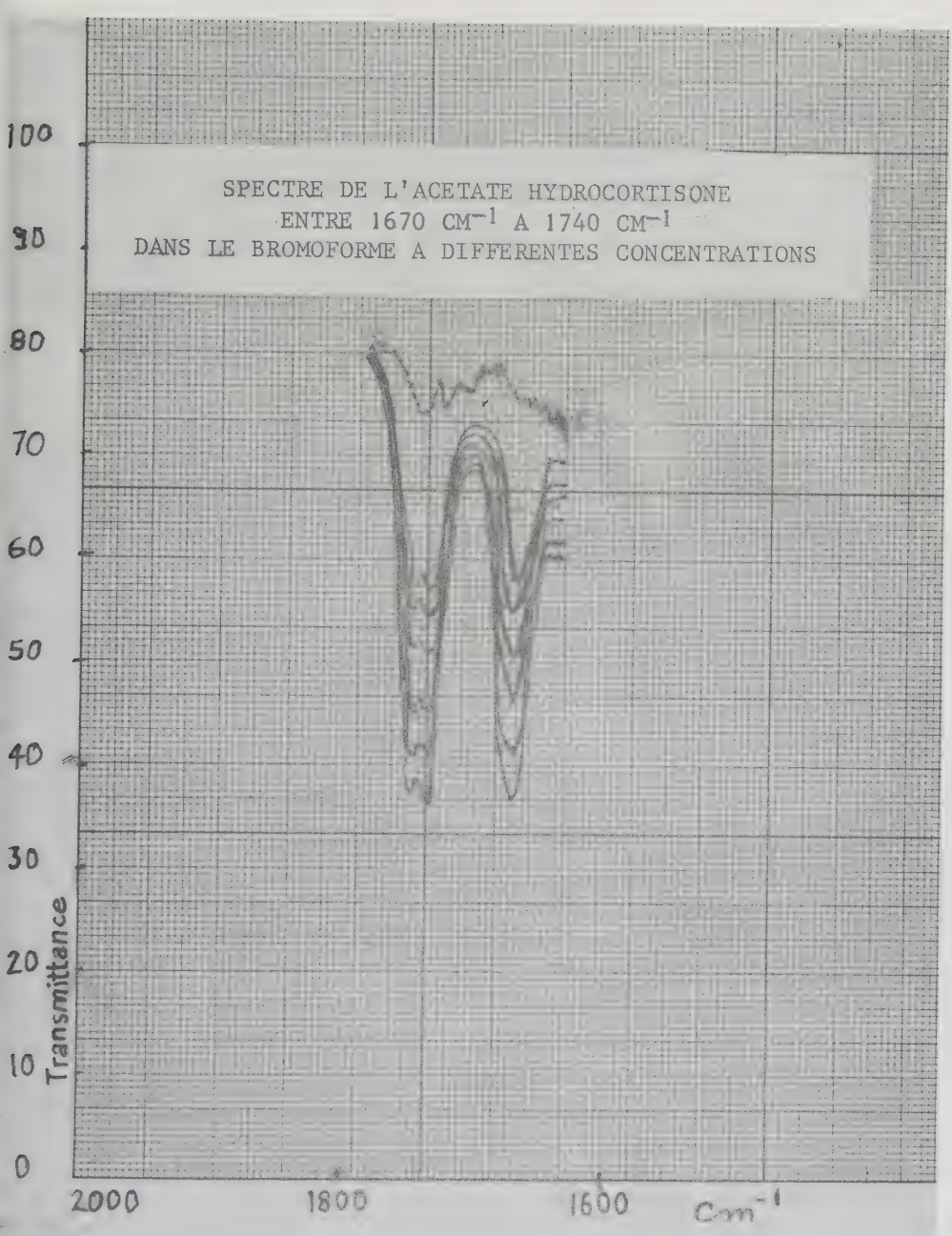
Tableau XI

Nom des spécialités	*Formes pharmac.*	*Composants*	*Résultats*	
			théoriques	*trouvés*
Hydrocortisone Roussel ®	Comprimés	Hydrocortisone	10 mg/comp.	9,7 mg/comp.
Hydrocortisone Roussel ®	Collyre	.Acétate d'hydrocortisone .Cloramphénicol .Nitrate phényl mercurique .Alcool benzylique	10 mg/ml	9,8 mg/ml



concentrations (mg)	3	2,4	2,1	1,5	0,9	0,6
D.O. à 1670 CM^{-1}	0,4	0,32	0,28	0,20	0,12	0,08

FIGURE 29 A



concentrations (mg)	6	5	4	3	2,4	2
D.O. à 1740 cm^{-1}	0,32	0,25	0,21	0,16	0,13	0,11
D.O. à 1670 cm^{-1}	0,31	0,255	0,215	0,17	0,135	0,11

FIGURE 29 B

C H A P I T R E V I

ANTIPYRETIQUES

Aspirine - Amidopyrine - Phénacétine - Caféïne

La détermination de l'Aspirine, de la Phénacétine, et de la Caféïne en mélange dans les médicaments pose souvent des problèmes difficiles.

WASHBURN et coll. (79) ont dosé la phénacétine, la caféïne et l'aspirine dans des comprimés et des capsules par spectrophotométrie dans l'infra-rouge entre 700 cm^{-1} à 4 000 cm^{-1}. Ils mettent à profit l'absorption de l'aspirine à 1 080 cm^{-1}, l'absorption de la phénacétine à 1 115 cm^{-1}, l'absorption de la caféïne à 980 cm^{-1}.

A partir des densités optiques, ils déduisent les quantités approximatives de chaque principe actif. Pour un dosage plus précis, la concentration obtenue à partir de la première approximation permet de déterminer les densités optiques dues à la phénacétine et à la caféïne à 1 080 cm^{-1}.

On les soustrait de la densité optique mesurée dans le premier essai, ce qui donne la quantité exacte d'aspirine dans le mélange; on procède de la même façon pour les deux autres composés.

Les auteurs précités ont également décrit (80) une méthode de détermination de la phénacétine, de la caféïne, de l'aspirine, et du chlorure de thénylène *(1)* dans des comprimés et des capsules.

En 1951, PARKE et coll. (54) ont étudié le mélange aspirine - phénacétine - caféïne - codéine - thénylpyramine *(2)*.

Nous avons repris ces travaux, car les méthodes longues, délicates et imprécises ne conviennent pas pour le dosage de routine.

Nous avons choisi une fréquence permettant de doser l'aspirine, l'amidopyrine, la phénacétine et la caféïne dans des mélanges et d'éviter les interférences.

La figure 30 représente chaque fréquence utilisée pour le dosage des composants.

(1) thénylène : antihistaminique. N-N-diméthyl N'-(pyridyl 2) N'-thényl éthylènediamine

(2) thénylpyramine : [(diméthylaminoéthyl-2) (thénylamino-2)] - 2 pyridine

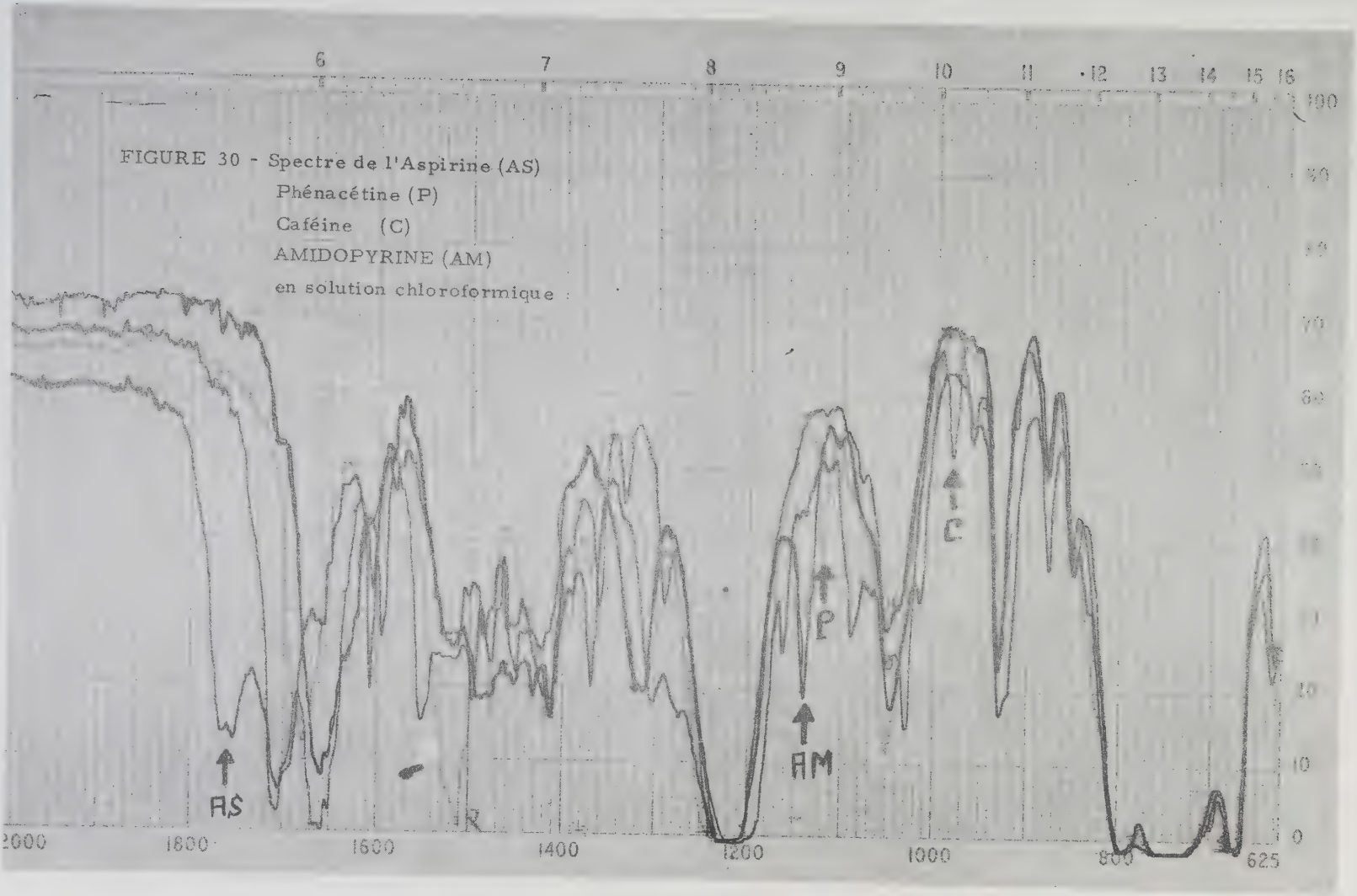


FIGURE 30 - Spectre de l'Aspirine (AS)
Phénacétine (P)
Caféine (C)
AMIDOPYRINE (AM)
en solution chloroformique

I. DOSAGE DE L'ASPIRINE.

1°. Principe.

Le dosage de l'aspirine est possible à 1 780 cm^{-1} à partir de solutions chloroformiques de concentrations variant entre 1,6 mg/ml et 5 mg/ml sous une épaisseur de 0,4 mm. La caféine et la phécacétine ne sont pas gênantes.

2°. Technique.

125 mg d'aspirine sont dissous dans 25 ml de chloroforme (5 mg/ml). On prépare une gamme de concentrations comprises entre 1,6 mg/ml et 5 mg/ml; on introduit successivement chaque dilution dans la cellule à NaCl. On lit à 1 780 cm^{-1} sous une épaisseur de 0,4 mm par rapport à la ligne de base du chloroforme (figure 31).

3°. Application.

Nous avons appliqué la méthode aux comprimés d'Ascéine® où l'aspirine est associée à la phénacétine et à la caféine.

On pulvérise un comprimé (400 mg) au mortier; la poudre obtenue est traitée par 2 fois 40 ml de chloroforme; on filtre; le volume est ramené à 100 ml. On obtient une solution contenant 4 mg/ml d'aspirine.

La lecture à 1 780 cm^{-1} n'est pas gênée par les autres composants des comprimés.

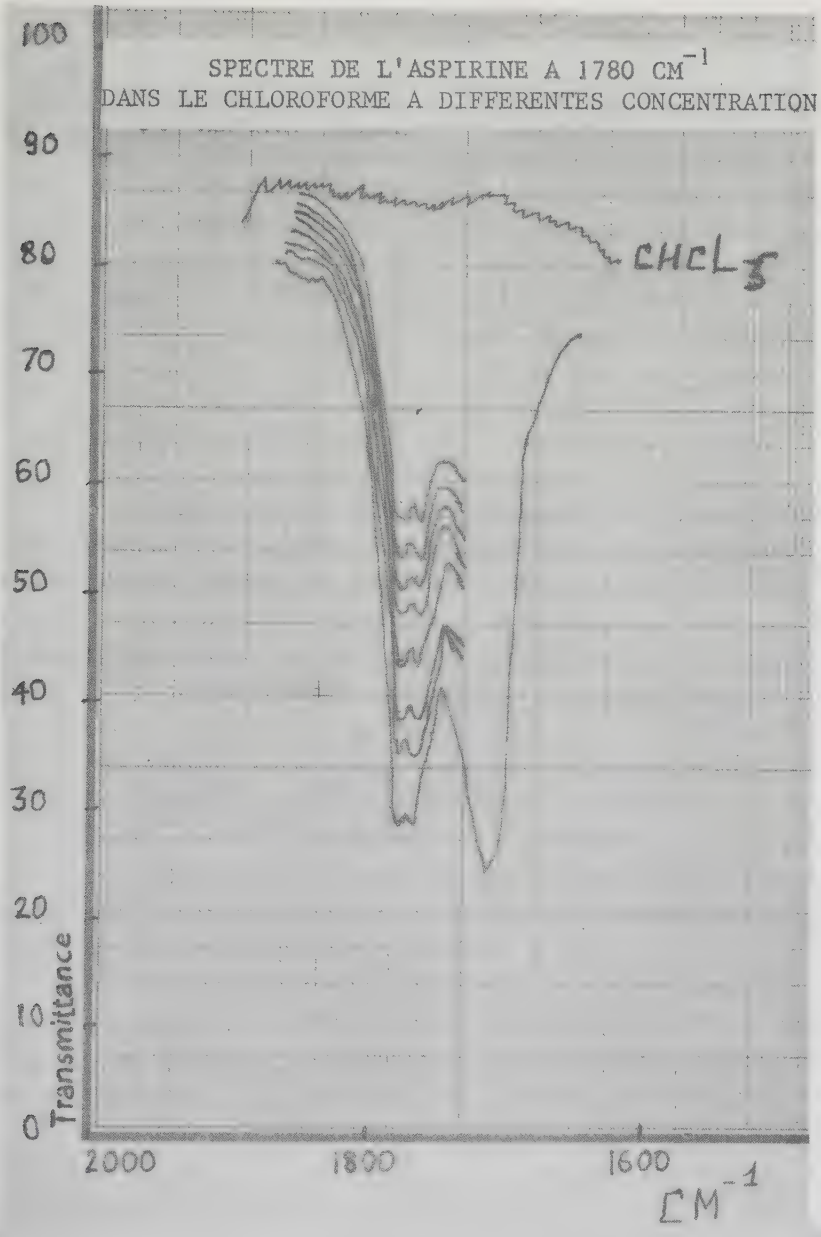
Le résultat obtenu est donné dans le tableau XII.

Tableau XII

Spécialité pharmac.	*Forme pharmac.*	*Composants*	*Aspirine*	
			théorique	*trouvé*
Ascéine®	Comprimés	. Aspirine . Phénacétine . Caféine	400 mg/comp.	398 mg/comp.

Remarque.

Il est possible de doser l'aspirine, en présence d'amidopyrine à 1 780 cm^{-1}, comme le montre la figure ; l'amidopyrine n'absorbe pas à cette fréquence.



ntrations (mg)	5	3,8	3,3	2,9	2,5	2,2	2	1,6
D.O.	0,47	0,36	0,33	0,28	0,235	0,215	0,19	0,165

FIGURE 31

II. AMIDOPYRINE.

1°. Principe.

On examine à 1 140 cm^{-1} une solution chloroformique d'amidopyrine contenant entre 3 et 18 mg par ml.

2°. Technique.

On dissout 360 mg d'amidopyrine dans 20 ml de chloroforme (18 mg/ml). On prépare à partir de cette solution une gamme allant de 3 mg/ml à 18 mg/ml.

On introduit chaque dilution dans la cellule à Nacl, on lit à 1 140 cm^{-1} par rapport à la ligne de base du chloroforme (figure 32).

3°. Applications.

Nous avons dosé l'amidopyrine dans les gélules Kalmine ®, où elle est associée à la phénacétine, à la caféïne et au sulfate de quinine *(1)*.

Une gélule contenant théoriquement 250 mg d'amidopyrine est traitée par deux fois 8 ml de chloroforme; on filtre, on amène le volume à 20 ml avec le même solvant.

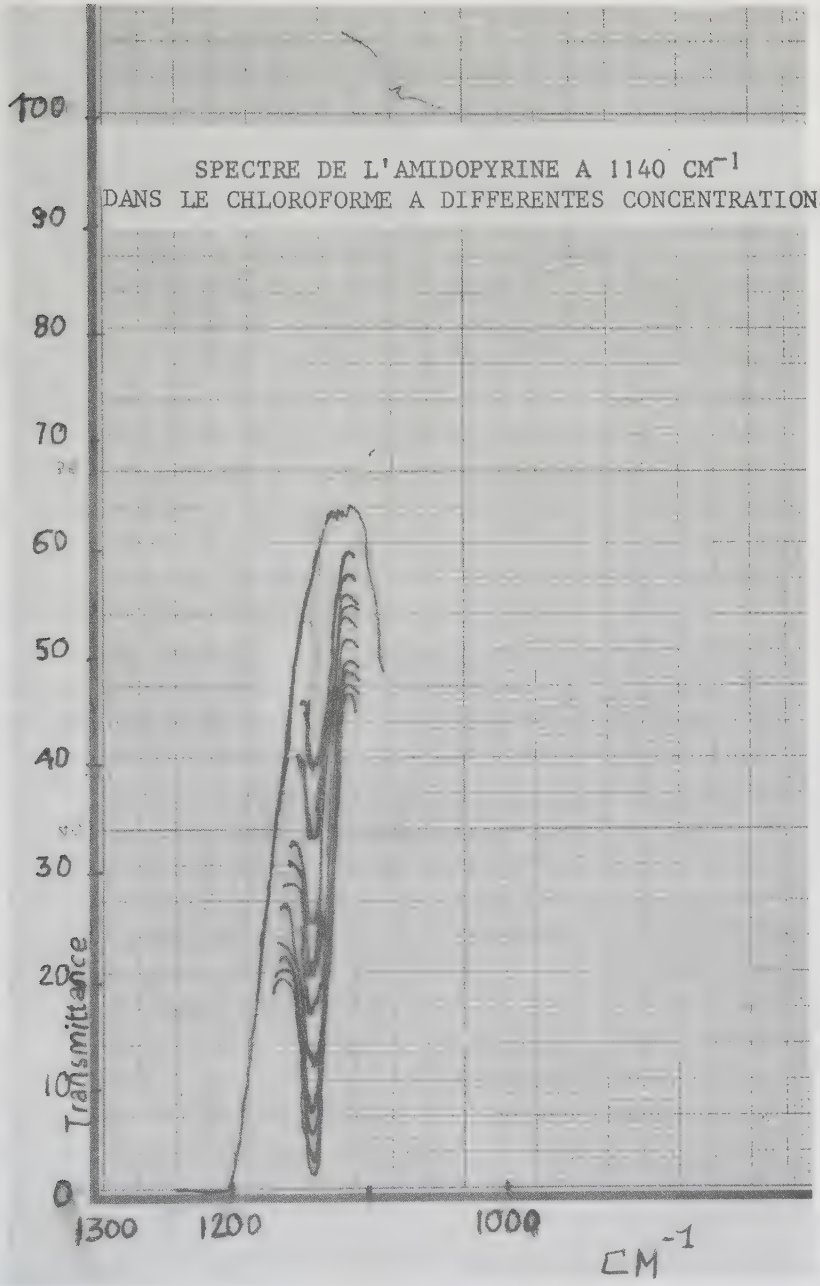
La solution doit contenir 12,5 mg/ml d'amidopyrine. On lit à 1 140 cm^{-1}; les autres principes actifs n'interfèrent pas.

Le tableau XIII rend compte du résultat.

(1) le sulfate de quinine est insoluble dans le chloroforme

Tableau XIII

Spécialité pharmac.	*Forme pharmac.*	*Composants*	*Amidopyrine*	
			théorique	*trouvé*
Kalmine ®	gélules	. Amidopyrine . Phénacétine . Caféïne . Sulfate de quinine	150 mg/gel.	249 mg/gel.



trations mg)	18	17	15,5	13,3	11,7	10	8	6,6	5	4	3
.o.	1,2	1,15	1	0,88	0,8	0,68	0,54	0,45	0,37	0,25	0,2

FIGURE 32

III. PHENACETINE.

1°. Principe.

La phénacétine peut être dosée à 1 120 cm^{-1} en solution chloroformique à des concentrations variant entre 5 mg/ml et 18 mg/ml, sous une épaisseur de 0,4 mm.

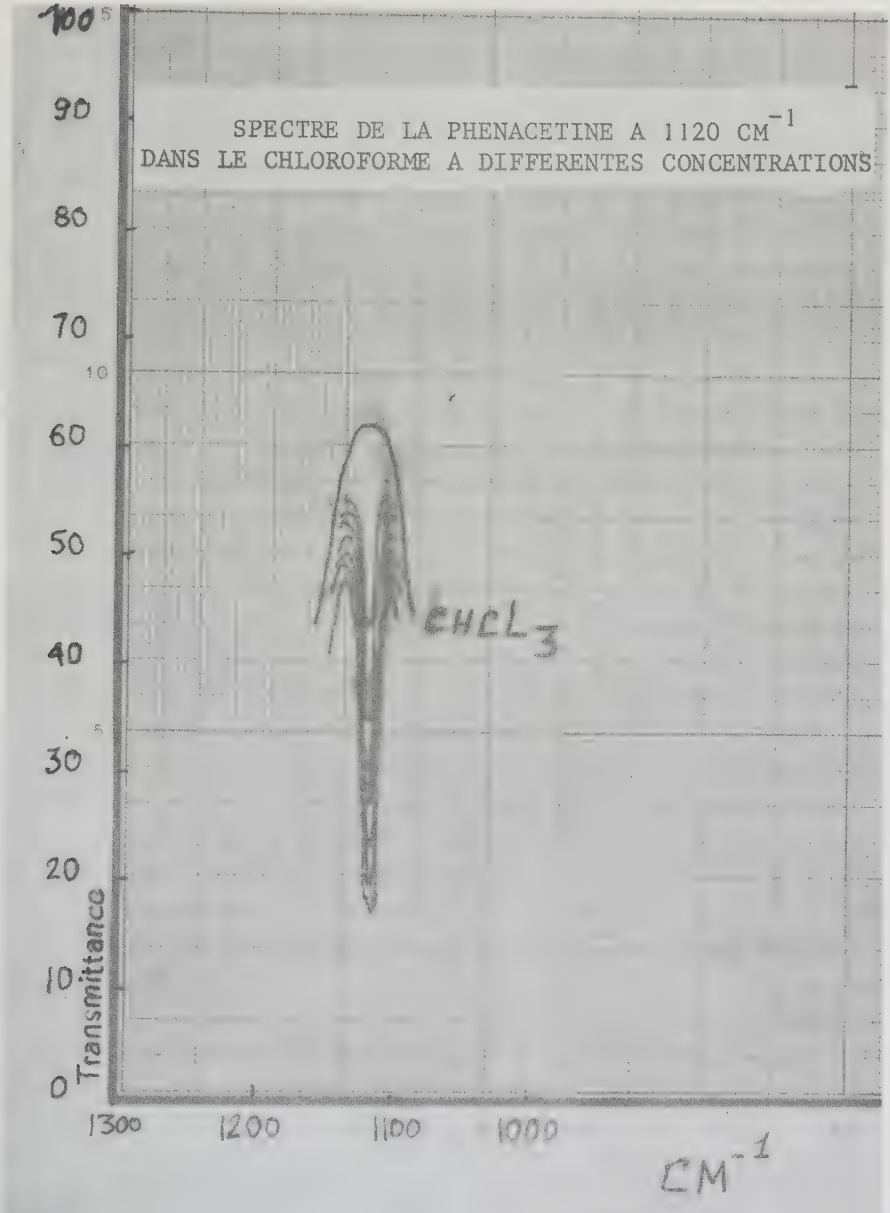
2°. Technique.

360 mg du phénacétine sont dissous dans 20 ml du chloroforme (solution 18 mg/ml).

On prépare une gamme entre 5 mg/ml et 18 mg/ml. On introduit chaque dilution dans la cellule à Nacl, la lecture est effectuée à 1 120 cm^{-1} par rapport à la ligne de base chloroforme (figure 33).

La caféine n'intervient pas, la phénacétine et l'amidopyrine, au contraire par suite du fond d'absorption, rend le dosage impossible.

La méthode est donc valable seulement pour un mélange phénacétine-caféine.



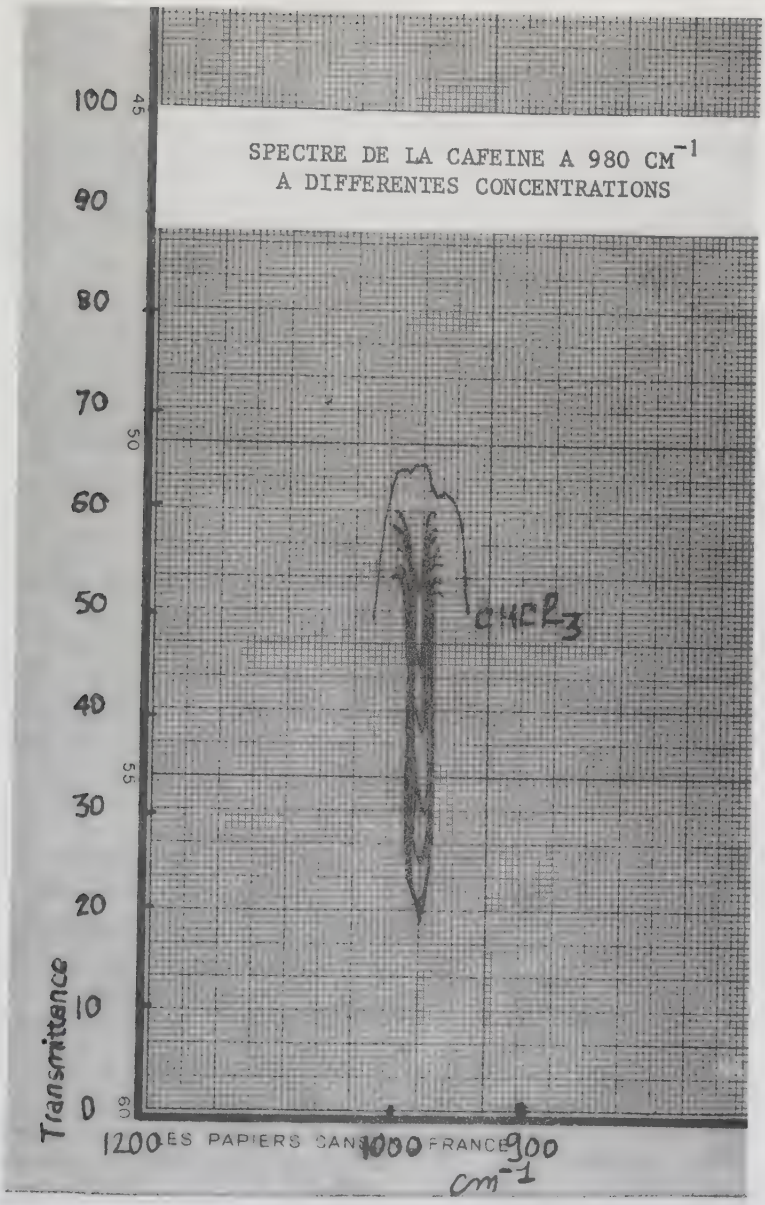
oncentrations (mg)	18	15,3	13,3	11,7	10	8	6,6	5
D.O.	0,49	0,42	0,355	0,33	0,28	0,23	0,2	0,14

FIGURE 33

IV. CAFEINE.

La caféine peut être dosée à 980 cm^{-1} en solution chloroformique à des concentrations variant entre 5 mg/ml et 16 mg/ml (figure 34).

Bien que les autres principes actifs (aspirine, phénacétine, amidopyrine) n'absorbent pas à cette fréquence comme le montre la figure 30, par suite de leur concentration élevée dans la prise d'essai, ils présenteront un fond d'absorption important rendant le dosage de ce dernier impossible en mélange.



concentrations (mg)	16	14	12	10	7	5
D.O.	0,27	0,23	0,20	0,17	0,12	0,08

FIGURE 34

C O N C L U S I O N S

Autrefois réservée aux études structurales, la spectrophotométrie infra-rouge est de plus en plus fréquemment mise à profit dans les différents secteurs de l'analyse. Outre la biologie, la toxicologie, le contrôle physico-chimique des médicaments y fait largement appel, car elle répond aux principaux critères qu'il impose : simplicité, rapidité d'exécution, spécificité, fidélité, sensibilité.

Nous avons envisagé un certain nombre d'applications qualitatives et quantitatives aux matières premières et aux médicaments terminés qui les contiennent. Les exemples ont été choisis dans six groupes thérapeutiques : vitamines, sulfamides diurétiques, alcaloïdes et bases organiques, antibiotiques, stéroïdes, antipyrétiques.

La spectrophotométrie infra-rouge nous apparaît comme une méthode très générale dont les avantages sont variés : précision et sensibilité notamment. Bien souvent elle évite les séparations imposées par les autres techniques.

Elle permet une identification irréalisable par d'autres moyens.

Dans certains cas toutefois les interférences entre les composants d'un mélange peuvent s'opposer à son emploi.

Il est souhaitable que la place qu'elle occupe déjà dans les laboratoires de contrôle de l'industrie pharmaceutique connaisse une importance accrue. Sans prétendre se substituer à l'une quelconque des méthodes classiques, telles que la spectrophotométrie ultra-violette et la chromatographie sur couche mince, elle apporte un complément d'informations, contribuant à une appréciation sans cesse améliorée de la qualité du médicament.

B I B L I O G R A P H I E

-o-

(1) - ALHA (A.R.) et TAMMINEN (V.) . -
Am . Med. Exp. Biol. Fenn., 1959, 37, 2,P.157-174.

(2) - ALMA et coll . -
J. Pharm. Sci., 1962, 51, 7, P. 617

(3) - ATKINSON (J.E.) . -
J. Pharm. Pharmacol. 1971,23, P. 781-785.

(4) - BALOTESCU et coll. -
Farmacia Roman, 1972, 20, n° 11,P.651-58.

(5) - BARBE (J.) et coll . -
Annal. Pharm, Franc., 1972, 30, n° 10,P. 665-672

(6) - BAKKER et coll . -
Recueil, 1961, 80, P. 1015

(7) - BIGEARD et coll. -
Ann. Pharm. Franc. , 1964, 22, P. 667.

(8) - BONNICHSEN (R.), MAEHLY (A.C.) . -
J. Chromatogr. 1960, 3, P. 190-192.

(9)- BOUCHE (R.) et coll . -
J. Pharm. Belg., 1966, 11-12, P. 529-560.

(10) - BOWLING BARNES et coll . -
Anal. Chem. 1947, 19, P. 620-627.

(11) - BRANDENBERGER (H.) et coll . -
Dtsch. Z. Ges. Med. 1966, 57, 1-2, P. 300-310.

(12) - BRITISH PHARMACOPOEIA 1953

(13) - BROWNING (R.) et coll . -
J. Am. Pharm. Ass. 1952, 41, P. 603.

(14) - BRUCE, SCOTT . -
J. Am. Pharm. Ass. 1955, 44, P. 377-379

(15) - BTARNE (M.M.) et coll . -
Ann. Pharm. Franc. , 1955, 13, P. 354-359.

(16) - CHOUTEAU (J.) et coll . -
Anal. Pharm. Franc. , 1963, 21, N°6, P.487-499.

(17) - CLEVERELY . -
Analyst. 1960, 85, P. 582-587.

(18) - COCLERS (L.) , DELAHAUT (R.) et VERSOLATO (A.) . -
J. Pharm. Belg., 1968, P : 475-491.

(19) - COLE et coll . -
Review of pure and Applied Chemistry, 1954, 4, P. 111.

(20) - COY (N.H.) et coll . -
Anal. Chem., 1949, 212, P.669-670.

(21) - DANIELSSON et coll . -
Acta Pharm. Suecica, 1965, 2, P. 47-61.

(22) - DOBRINER et JONES . -
in "vitamins and hormones edited by HARRIS R.S. THIAMMANN Vol. VII P. 293, 1949 (New-York) .

(23) - DOBRINER et JONES . -
"infrared absorption spectra of stéroïds An Atlas" 1953 (LONDON).

(24) - EDWARDS (D.) et coll . -
J. Pharm. , 1971, 23, P. 956-962.

(25) - FREDERICK et coll . -
J. Am. Pharm. Ass. 1949, 38, P. 173-174.

(26) - FRENCH (W.N.) et coll . -
J. Pharm. Sci. 1965, 54, 8, P. 1133-1136.

(26A) - FURCHGOTT et coll . -
J. Biol. Chem., 1946, 164, P. 621.

(27) - GENES et coll . -
Anal. Chem. , 1962, 34, 11, P. 1464-1468.

(28) - GODDYEAR (J.M.) et MURPHY (H.W.) . -
J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.,
1949,33, P.129.

(29) - HANS NOLL et coll . -
J. Biol. Chemist., 1960, N° 8,P. 235.

(30) - HAYDEN et coll. -
J. Am. Pharm. Ass. Sci., 1960, 49, 8, P.497-502.

(31) - HAYDEN et coll . -
J. Am. Pharm. Ass., 1960, 49, P.489-496.

(32) - HAZEROUCQ (G.) . -
In utilisation des methodes physiques d'analyse
dans le contrôle des médicaments.
Bull. Ordre pharmacien 1972.

(33) - I.R. Chloramphénicol. -
Pharm. Berl. 1972, 305 (12), P. 877-887.

(34) - JAMES ET coll. -
Anal. Chem. 1957, 29, P. 468-470.

(35) - JONAS CAROL . -
J. Am. Pharm. Ass. , 1950, 16, 8,P.425.

(36) - JONES et coll. -
J. Org. Chem. 1954, 19, P. 1252.

(37) - KINUMAKI et coll.
Sci. Repts. Research inst. TOHOKU Univ.
Ser., 1956,8, P. 263.

(38) - KOCH et coll. -
J. Chem. Soc., 1951, P. 512.

(39) - KUHNERT (M.) . -
Acta Pharma., 1970, octobre, P. 580-590.

(40) - LEEKUM-TATT
J. Pharm. Pharmacol. 1958, 10, P. 621-624.

(41) - LOHMMANN (H.) . -
Anal. Chem. 1963, 35, P. 707-711.

(42) - LUNDE (K.) . -
Acta. Chem. Scand. 1959, 13, P. 2154

(43) - MEBANE (A.D.) . -
Anal. Chem., 1959, 28, 37 A

(44) - MESLEY (R.J.) coll. -
J. Pharm. Pharmacol, 1970, 22, P. 321-332.

(45) - MESLEY (R.J.) coll. -
J. Pharm. Pharmacol., 1967, 19, P. 295-304.

(46) - MILLS (A.L.) et coll. -
Anal. Chem. 1963, 35, P. 416

(47) MINKA et QURKEWICH . -
Farm., 1970, 25, P. 13-17.

(48) - MORRIS (W.W.) et coll. -
Anal. Chem. Scand., 1959, 13, P. 2154.

(49) - MULLER (P.B.) et MOOR (H.) . -
Trav. Chim. Aliment. Hyg. 1949,40, P. 397.

(50) - NEUSS et coll. -
J. Org. Chem., 1957, 22, P. 1001-1006.

(51) - PAGE (J.E.) et coll. -
Chemistry and Industry, 1957, January 19, P.58-63;

(52) - PAPINEAU-COUTURE . -
J. Am. Pharm. Ass., 1950, 391, P. 683-686.

(53) - PAPINEAU-COUTURE . -
Anal. Chem., 1952, 24, P. 1918-1921.

(54) - PARKE et coll. -
Anal. Chemist., 1951, 23, N° 7, P. 953-957.

(55) - PARKER et coll. -
Appl. Spectroscopy, 1961, 15, P. 96-99.

(56) - PARSONS (W.H.) . -
J. Am. Pharm. , 1961, 133, P. 411-421.

(57) - Pharmacopeé Française IX Edition Page I - 185

(58) - Pharmaceutical institue, médical faculty university of Kyoto 1956

(59) - PLEAT (G.B.) et coll. -
J. Am. Pharm. Ass., 1951, 40, P. 107-110.

(60) - Quantitative détermination of a mixture of thiolutin and aureothricin by spectrophotometry I.R.
J. Pharm. Soc. Japan, 1959, 79, P. 223-225.

(61) - RIDGWAY (K.) . -
J . Pharm. Franç., 1964, 22, P. 667

(62) - ROZNKRANTZ et coll. -
Anal. Chem., 1958, P. 957-977.

(63) - RYAN et coll.-
Anal. Chim. Acta., 1971, 55, P. 83-87.

(64) - SCHWARTZ (H.P.) et coll . -
Appl. Spectr., 1958, 12, P. 35.

(65) - SINSHEIMER et coll. -
J. of. Pharm. Sci., 1966, 55, 11, P. 1240.

(66) - SPARAGNANA (L.) et MASON(W.B.) . -
Anal. Chem., 1962, 34, P. 242.

(67) - SZILAGYL . -
Nature, 1962, 20, P. 243.

(68) - SWEENEY (J.P.) et HALL (W.L.) . -
Anal. Chem., 1951, 23, P. 983.

(69) - TAMMINEN (V.) et ALMA (A.R.) . -
Suom. Kemistilehti, 1949, 32, 119-121.

(70) - THOMPSON et coll . -
J. Of. Pharm. Sci., 1965, 54, P. 1819-21.

(71) - URBANYI (T.) et coll . -
J. Pharm. Sci., 1966, 55, 7, P. 730-732.

(72) - Use of I.R. spectroscopy in quantitative analysis of drugs, détermination of several acid barbiturique dérivatives.
Acta. Pol. Pharm. 1972, 29 (4), P. 375-84.

(73) - U.S.P. Pharmacopoeia XV

(74) - VANDENBOSSCHE . -
Kongr. Pharm. Wiss. Vrtr. Orig.
Nalmitt, 23, Muenster (West Falen), Ger, 411-425 (1963).

(75) - WARREN Et coll. -
J. Am. Pharm. Sci., 1966, 55, N° 2, P. 144-150.

(76) - WARREN et coll. -
J. Pharm. Sci., 1965, 54, 12, P. 1806-1807.

(77) - WASHBURN (W.) . -
J. Am. Pharm. Ass.,1952, 41, P. 603.

(78) - WASHBURN (W.) . -
J. Am. Pharm. Ass., 1954, 43, P. 48-49.

(79) - WASHBURN (W.) . -
J. Am. Pharm. Ass., 1949, 12, ?° 24 . P. 623-25.

(80) - WASHBURN (W.) . -
J. Am. Pharm. Ass., 1950, 39, P. 473-474.

(81) - WASHBURN (W.) et coll. -
Anal. Chem.,1955, 27, P. 1812-1813.

(82) - WEIGL (J.W.) et coll. -
Anal. Chemist., 1952, 242, N° 9,P. 1483-86.

(83) - WRIGHT (N.) . -
Ind. Emg. Chem. Anal., 1941, 13, 1.

On trouvera également des renseignements sur les applications spectrophotométrie I.R. au contrôle des médicaments dans les publications suivantes :

(84) - ALICE (Marie) . -
La spectroscopie I.R. et ses applications en chimie organique. Dunod Paris 1970.

(85) - BOUCHER et coll. -
L'utilisation de la spectrophotométrie I.R. Dans l'analyse des médicaments .
J. Pharm. Belg. 1968, 23, N° 1-2, P. 41-59, N° 3-4, P. 197-221.

(86) - BOUSQUET . -
Spectroscopie instrumentale
Paris DUNOD 1969.

(87) - CAROL (J.) et coll. -
Application of infrared spectrophotometry pharmaceutical analysis
J. of Pharm. Sci., 1961, vol 50, N° 6.

(88) - CAROL (J.) . -
Report on infrared spectrophotometry méthods for drugs, of various pharmaceutical .
J. Ass. of. Agr. Chemist., 1955,38, P. 638-43

(89) - CONN . -
Infrared methods principles and applications
New-York, LONDON, Academic Press 1960.

(90) - CROSS (A.D.).-
Introduction to pratical infrared spectroscopy
Butterworths 1960.

(91) - DELHAYE (M.) . -
Emplois des Lasers en analyse chimique
Azoulay PARIS 1971.

(92) - DYER (J.R.) . -
Spectroscopie d'absorption appliquée aux composés organiques.

(93) - EVANS (J.C.) . -
Spectroscopie I.R.
Anal. Chem., 1964, 36, N° 5, Part. 1.

(94) - GUY (Jean) . -
Les possibilités de la spectrophotométrie I.R. en analyse organique.
Chimie Analyt. et de l'analyse Bromatologie, 1961, 9, P. 38-62.

(95) - POTTS (W.J.) . -
Chemical I.R. Spectrometry, vol. I, Wiley, New-York 1963.

(96) - PRICE . -
Infared spectroscopy and its applications to pharmaceutical analysis.
J. Pharm. Pharmacol., 1955, 7, P. 153-166.

(97) - Principe de la spectrophotométrie I.R. et ses applications à l'analyse.
"Journal Sci. 1969 Conf. Communic".
Liège, Cercle Sci anciens élèves inst.Agilkinet.

(98) - ROCCHICCIOLI . -
Application de la spectrophotomètre d'absorption I.R. à l'analyse chimie analyt. , vol. 53, N° 4, 1971.

(99) - ROCCHICCIOLI . -
Applications récentes de la spectrophotométrie I.R. à l'analyse des composés organiques .
Chimie Analy. Franç. , 1970, 52, N° 3, P. 273-82.

(100)- ROCCHICCIOLIS . -
Introduction à la pratique de la spectroscopie I.R.
PARIS AZOULAY 1967.

(101)- ROBINSON (David) . -
Quantitative analysis with infrared spectrophotomètres.
Analyt. Chemistry., 1952, 24, N° 4, P. 619.

(102) - Spectroscopie I.R. des médicaments F. Moll. Arch. Pharm., 1971, 304, N°6, Mitteinlugen 145-62.

(103) - THOMPSON . -
Applications of infrared spectroscopy
Chemistry and Industry , 1957, P.92-95.

EDITIONS BERGERET 71/73, rue Leyteire, 33000 - BORDEAUX
TEL (56) 91.12.59.

DEUXIEME THESE

R.M.N. ET CONTROLE PHYSICO-CHIMIQUE DES MEDICAMENTS

Vu, le président du jury,

P. MESNARD